

Centro de Investigaciones  
Tecnológicas



Departamento de  
Química Analítica

Universidade da Coruña

# DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN POLIOLEFINAS Y SUS NIVELES DE MIGRACIÓN

M. Sonia Dopico García  
Diciembre, 2004



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
LABORATORIO DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓNS TECNOLÓXICAS

U

## **DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN POLIOLEFINAS Y SUS NIVELES DE MIGRACIÓN**

Memoria presentada por  
**M<sup>a</sup> Sonia Dopico García**  
Para optar al grado de Doctor  
21 de Diciembre de 2004





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Campus da Zapateira, s/n.  
15071 A Coruña  
España - Spain  
Teléfono 981 16 70 00  
Fax 981 16 70 65

**SOLEDAD MUNIATEGUI LORENZO**, Catedrática de  
Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica de la  
Universidade da Coruña.

**AUTORIZA** a M<sup>a</sup> Sonia Dopico García a presentar el trabajo  
titulado "Determinación de antioxidantes en poliolefinas y sus niveles de  
migración" para optar al grado de Doctor.

A Coruña, a 21 de Diciembre de 2004

Fdo. **Soledad Muniategui Lorenzo**





## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

CENTRO DE INVESTIGACIÓNS  
TECNOLÓXICAS (C.I.T.)

Campus de Esteiro, s/n - 15403 Ferrol  
Tel.: 981 33 74 00 -Ext.: 3401  
Fax: 981 33 74 10  
e-mail: cit@cdf.udc.es

**M<sup>a</sup> VICTORIA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ**, Catedrática de  
Escuela Universitaria del Departamento de Química Analítica de la  
Universidade da Coruña y **JOSÉ MANUEL LÓPEZ VILARIÑO**, doctor.

### CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada "Determinación de antioxidantes en poliolefinas y sus niveles de migración", se ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Química del Centro de Investigacións Tecnolóxicas de la Universidade da Coruña.

Y para que así conste a los efectos oportunos firman la presente en Ferrol a 21 de Diciembre de 2004.

Fdo. **M<sup>a</sup> Victoria González Rodríguez**



Fdo. **José M. López Vilariño**



Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas y entidades que de alguna manera me han ayudado a realizar este trabajo:

A los directores de este trabajo, Victoria González Rodríguez y José M. López Vilariño, por todo su apoyo, orientación y ayuda durante estos años.

Al Departamento de Química Analítica de *A Universidade da Coruña*, en especial a su directora Soledad Muniategui, por permitir la realización de esta memoria.

A los miembros del Departamento de Química Analítica del campus de Ferrol, por su apoyo en diferentes momentos y especialmente a Elena González por su contribución en la etapa de extracción de microondas.

A los directores del *Centro de Investigacións Tecnolóxicas (CIT)* de *A Universidade da Coruña* durante el período de realización de este trabajo, Javier Cuadrado y Luis Barral, por permitirme llevar a cabo esta labor investigadora en el laboratorio de Química del Centro.

A los miembros del Laboratorio de Plásticos del *Centro de Investigacións Tecnolóxicas* por su asesoramiento y apoyo técnico.

A la Xunta de Galicia por su financiación a través del *Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica*.

A las distintas personas que han ido formando parte del laboratorio de Química del CIT. Me gustaría destacar que para mí esta tesis ha supuesto además del aprendizaje en la labor de investigación, el trabajo conjunto con un grupo de personas, muy diferentes entre sí, los directores de tesis, Victoria y Vilariño y mis compañeras de laboratorio, Fini, que formó parte de este trabajo desde el primer momento haciéndolo también un poco suyo y María, que se incorporó en la última etapa. Por ello, quiero agradecerles a todos ellos lo que se han implicado y lo que han aportado a este trabajo. Tampoco quiero olvidarme de Elisa, Alba y Lía, que en diferentes momentos han echado una mano.

A Antonio y Dani por solucionar todos los problemas informáticos que me han ido surgiendo con ordenadores, programas y virus.

---

A los amigos y compañeros que se han interesado por cómo iba esta tesis, ofreciéndome ayuda o dándome ánimos, que todo viene bien, para terminarla y en definitiva me han ayudado en lo que han podido.

Y por último y muy especialmente, me gustaría agradecer a mi familia, a mis padres y a mi hermana (por esperarme) toda su paciencia y apoyo durante estos años, porque ya teníamos todos muchas ganas de terminar la tesis.



Índice de figuras .....	i
Índice de tablas .....	v
Índice de acrónimos .....	ix
<b>Capítulo I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1 Uso de materiales plásticos como envases para alimentos .....	5
2 Empleo de aditivos en la formulación de envases de poliolefinas .....	8
3 Problemática del uso de aditivos .....	12
4 Características de los ensayos de migración .....	22
5 Características de los antioxidantes.....	38
6 Referencias bibliográficas.....	55
<b>Capítulo II. Objetivos .....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo III. Determinación de migración global en aceite de     oliva .....</b>	<b>75</b>
1 Introducción .....	79
2 Metodología experimental .....	87
3 Desarrollo del método analítico.....	92
4 Aplicación a muestras comerciales .....	96
5 Conclusiones.....	98
6 Referencias bibliográficas.....	99

---

<b>Capítulo IV. Separación cromatográfica de antioxidantes.....</b>	<b>105</b>
1 Introducción .....	109
2 Separación cromatográfica de antioxidantes en simulantes acuosos .....	114
3 Separación cromatográfica de antioxidantes en el simulante D .....	128
4 Conclusiones .....	137
5 Referencias bibliográficas .....	138
 <b>Capítulo V. Tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica.....</b>	 <b>147</b>
1 Introducción .....	151
2 Extracción líquido-líquido en simulante A .....	159
3 Extracción SPE en los simulantes acuosos A, B y C .....	175
4 Determinación de migración específica de antioxidantes en simulante D .....	192
5 Conclusiones .....	200
6 Referencias bibliográficas .....	202
 <b>Capítulo VI. Determinación de antioxidantes en muestras de poliolefinas .....</b>	 <b>211</b>
1 Introducción .....	215
2 Puesta a punto de la extracción de antioxidantes mediante energía de microondas.....	221
3 Condiciones de extracción finales mediante energía de microondas.....	236



4	Precisión del método, límites de detección y cuantificación. ....	238
5	Estabilidad de Irgafos 168 en diclorometano .....	240
6	Conclusiones.....	241
7	Referencias bibliográficas.....	242
 <b>Capítulo VII. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes A, B, C y D .....</b>		
		<b>247</b>
1	Introducción .....	251
2	Ensayos preliminares del estudio de estabilidad .....	255
3	Procedimiento experimental .....	256
4	Resultados .....	259
5	Conclusiones.....	273
6	Referencias bibliográficas.....	274
 <b>Capítulo VIII. Estudio de composición y migración de muestras. 277</b>		
1	Introducción .....	281
2	Envases poliméricos comerciales .....	284
3	Poliiolefinas extruidas en el laboratorio.....	297
4	Conclusiones.....	305
5	Referencias bibliográficas.....	306
 <b>Capítulo IX. Conclusiones .....</b>		
		<b>309</b>
 <b>Anexo .....</b>		
		<b>315</b>

# Índice de figuras

---

<b>Capítulo I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
Figura 1. Evolución del consumo de los mercados de plásticos en España.....	6
Figura 2. Participación de los mercados en el consumo estimado año 2003.....	7
Figura 3. Propuesta de metodología a seguir por los laboratorios oficiales para controlar si un material polimérico cumple la legislación ... ..	17
Figura 4. Comparación de los resultados teóricos y experimentales de migración específica para el aditivo Irganox 1076 en ... ..	19
Figura 5. Coeficientes de difusión en polipropileno virgen e hinchado a 40 °C (hinchado por gliceril triperlargonato).... ..	20
Figura 6. Ejemplos de soportes utilizados para sujetar las láminas de plástico en los ensayos de migración por inmersión total ... ..	33
Figura 7. Ejemplo de celda normalizada de acuerdo con la norma.....	34
Figura 8. Formación de hidroperóxidos asociados y libres en la oxidación térmica a 80 °C de films de 500 µm (gráficas doble logarítmicas) ... ..	39
Figura 9. Reacciones de oxidación térmica de las poliolefinas.... ..	39
Figura 10. Efecto del uso combinado de antioxidantes fosfito y fenólicos en la estabilización de poliolefinas.... ..	43
Figura 11. Representación esquemática de la evolución en las propiedades mecánicas de PP estabilizado mediante antioxidantes ... ..	48
 <b>Capítulo III. Determinación de migración global en aceite de oliva .....</b>	 <b>75</b>
Figura 1. Celda de vidrio empleada en los ensayos de migración global. ....	88
Figura 2. Cromatograma obtenido bajo las condiciones de elución de la tabla I para una disolución patrón de aceite de oliva 383 mg L <sup>-1</sup> .....	90
Figura 3. Cromatograma del blanco de procedimiento de migración global en aceite de oliva para una muestra de PP. ....	91
Figura 4. Determinación aceite absorbido mediante el método oficial y el método desarrollado. ....	92
Figura 5. Aceite de oliva absorbido por la muestra de PP 1 en el ensayo de migración global (411 mg L <sup>-1</sup> aceite y 150 mg L <sup>-1</sup> glucosa). ....	97



---

<b>Capítulo IV. Separación cromatográfica de antioxidantes .....</b>	<b>105</b>
Figura 1. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de antioxidantes de 5 mg L <sup>-1</sup> con columna Nova Pack C <sub>18</sub> (276 nm). ....	116
Figura 2. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de antioxidantes de 5 mg L <sup>-1</sup> a 276 nm con columna Symmetry C <sub>18</sub> . ....	121
Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C <sub>18</sub> . ...	126
Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes ... (continuación) .....	127
Figura 4. Cromatograma obtenido para una disolución 5 mg Kg <sup>-1</sup> de antioxidantes en aceite de oliva que incluye la ... ..	130
Figura 5. Cromatograma obtenido para una disolución 5 mg Kg <sup>-1</sup> de antioxidantes en aceite de oliva después de diluir 2 g de disolución ...	131
Figura 6. Cromatograma obtenido para un blanco de aceite de oliva a 220 nm (2 g de aceite de oliva hasta 5 mL de THF). ....	131
Figura 7. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes en aceite de oliva. ....	135
Figura 7. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes... (continuación). ....	136
<b>Capítulo V. Tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica.....</b>	<b>147</b>
Figura 1. Influencia del pH en la recuperación de los antioxidantes en una muestra acuosa sobrecargada hasta 0,1 mg L <sup>-1</sup> mediante LL-HPLC. ..	163
Figura 2. Cartas Pareto de los efectos principales estandarizadas (P = 95%) para el diseño Plackett-Burmann. ....	166
Figura 3. Diagramas de efectos principales de primer orden para el diseño Plackett-Burman. ....	168
Figura 4. Superficies de respuesta estimadas a partir del diseño compuesto central para pH frente a tiempo de extracción... ..	171

## Índice de figuras

Figura 5. SPE de antioxidantes con derivatización previa mediante $\text{NaHCO}_3$ y anhídrido acético. ....	179
Figura 6. Recuperaciones obtenidas para la SPE con diferentes condiciones de derivatización. ....	180
Figura 7. SPE de antioxidantes con derivatización previa mediante $\text{Na}_2\text{CO}_3$ y anhídrido acético. ....	180
Figura 8. SPE con derivatización previa mediante $\text{Na}_2\text{CO}_3$ y anhídrido acético en los simulantes acuosos. ....	181
Figura 9. Determinación del volumen de elución para la SPE de antioxidantes. ....	186
Figura 10. Recuperaciones alcanzadas para el ensayo de volumen de ruptura mediante SPE $\text{C}_{18}$ para muestras con etanol al 10% ...	188
Figura 11. Cromatogramas a 220 y 276 nm para una disolución de antioxidantes en aceite de oliva $5 \text{ mg Kg}^{-1}$ analizada ...	197
Figura 12. Cromatogramas a 220 nm para una disolución de antioxidantes en aceite de oliva $5 \text{ mg Kg}^{-1}$ analizada mediante LL-HPLC-UV. ....	198
<b>Capítulo VI. Determinación de antioxidantes en muestras de poliolefinas .....</b>	<b>211</b>
Figura 1. Cromatograma de una disolución patrón de $5 \text{ mg L}^{-1}$ de Irgafos 168 oxidado en diclorometano con su espectro de absorción. ....	223
Figura 2. Cromatograma de una disolución patrón de $5 \text{ mg L}^{-1}$ de Irganox 1076 e Irgafos 168 en diclorometano con sus espectros de absorción. ....	224
Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal ...	225
Figura 4. Cartas de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño Plackett-Burman. Las líneas verticales definen el intervalo ...	229
Figura 5. Cartas de Pareto de los efectos de segundo orden en el diseño Plackett-Burman. ....	230
Figura 6. Gráfico de efectos de interacción entre la mezcla de disolventes y la temperatura de extracción ( $^{\circ}\text{C}$ ) en el diseño Plackett-Burman. ....	231
Figura 7. Gráfico de efectos de interacción entre el tiempo de calentamiento (minutos) y la temperatura de extracción ( $^{\circ}\text{C}$ ) en ...	231

---

Figura 8. Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto central 2 <sup>3</sup> + star...	234
Figura 9. Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto central 2 <sup>2</sup> + star...	236
Figura 10. Cromatograma de los antioxidantes extraídos a partir de una muestra de PEBD mediante energía de microondas...	238
<b>Capítulo VII. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes</b>	
A, B, C y D .....	247
Figura 1. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 5 °C. ....	261
Figura 2. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 40 °C. ....	262
Figura 3. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 70 °C. ....	265
Figura 4. Cromatogramas obtenidos para el ensayo de estabilidad del E330 a 40 °C en el simulante A (276 nm) a lo largo de 60 días. ....	270
Figura 5. Áreas del E330 y sus compuestos de degradación a 276 nm. ....	272
<b>Capítulo VIII. Estudio de composición y migración de muestras.....</b>	
Figura 1. Muestra CL/0054/04 analizada mediante el método MAE-HPLC... ..	287
Figura 2. Dendograma obtenido para las muestras de envases comerciales ....	291
Figura 3. Migración específica en ácido acético al 3% (simulante B) de la muestra CL/0033/04 a 40 °C y 10 días... ..	296
Figura 4. Migración específica en agua destilada (simulante A) de la muestra CL/0054/04 a 40 °C y 10 días... ..	297
Figura 5. Muestra CL/0030/04 analizada mediante el método MAE-HPLC.....	300
Figura 6. Migración específica en aceite de oliva de la muestra CL/0030/04 ...	304



# Índice de tablas

---

<b>Capítulo I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
Tabla I. Legislación sobre migración actualmente en vigor. ....	24
Tabla II. Condiciones de tiempo y temperatura para los ensayos de migración [Directiva 82/711/CEE]. ....	32
Tabla III. Condiciones de contacto entre la muestra y el simulante en los ensayos de migración [UNE-ENV13130-1 y UNE-EN1186]. ....	32
Tabla IV. Ejemplo de la selección del simulante a utilizar para cada alimento en concreto. ....	37
Tabla V. Concentración de antioxidantes y características físicas de diferentes poliolefinas. ....	47
Tabla VI. Límites de migración establecidos para los antioxidantes estudiados. ....	50
Tabla VII. Concentración máxima permitida en las poliolefinas destinadas a entrar en contacto con alimentos. ....	52
Tabla VIII. Valores de LD <sub>50</sub> y toxicidad de los antioxidantes estudiados .....	54
 <b>Capítulo III. Determinación de migración global en aceite de oliva .....</b>	<b>75</b>
Tabla I. Condiciones de elución mediante HPLC-ELSD para el análisis del aceite de oliva absorbido en el método de determinación de ... ..	90
Tabla II. Comparación de varios modelos de regresión para la curva de calibrado HPLC-ELSD. ....	94
Tabla III. Cuantificación del nivel de migración (mg dm <sup>-2</sup> ) de varias ....	94
Tabla IV. Recuperaciones obtenidas para muestras de PP sobrecargadas con diferentes cantidades de aceite. ....	96
Tabla V. Niveles de migración global en aceite de oliva para diferentes... ..	97
 <b>Capítulo IV. Separación cromatográfica de antioxidantes.....</b>	<b>105</b>
Tabla I. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con una columna Nova Pack C <sub>18</sub> . ....	115
Tabla II. Definición de los parámetros cromatográficos utilizados para caracterizar las condiciones de análisis. ....	118



---

Tabla III. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes con ...	119
Tabla IV. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con una columna Symmetry C <sub>18</sub> .	120
Tabla V. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes ....	122
Tabla VI. Repetibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en acetonitrilo con columna Symmetry C <sub>18</sub> .	124
Tabla VII. Reproducibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con columna Symmetry C <sub>18</sub> .	124
Tabla VIII. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C <sub>18</sub> .	125
Tabla IX. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en aceite de oliva.	129
Tabla X. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes en aceite de oliva.	132
Tabla XI. Repetibilidad del método HPLC-UV para la determinación de...	133
Tabla XII. Reproducibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en aceite de oliva.	134
Tabla XIII. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para	136
<b>Capítulo V. Tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica</b>	<b>147</b>
Tabla I. Efecto del disolvente en la re-disolución del residuo tras la evaporación en la extracción LL.	161
Tabla II. Niveles de los factores en el diseño de experimentos.	164
Tabla III. Matriz de diseño y recuperaciones en el Plackett-Burman ...	165
Tabla IV. Matriz de diseño y recuperaciones en el diseño compuesto central.	170
Tabla V. Condiciones finales de determinación de antioxidantes en agua mediante LL-HPLC-UV.	172

## Índice de tablas

Tabla VI. Repetibilidad del método analítico LL-HPLC-UV (n=6) para una muestra acuosa de 100 mL sobrecargada hasta 0,1 mg L <sup>-1</sup> y ...	173
Tabla VII. Límites de detección y cuantificación del método analítico LL-HPLC-UV considerando la relación de ...	174
Tabla VIII. Resultados de los ensayos de migración específica a partir de muestras de PEBD.	175
Tabla IX. Selección de las condiciones de los reactivos de derivatización.	179
Tabla X. Procedimiento de SPE de antioxidantes a partir de los simulantes A o B con acetilación previa mediante Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y anhídrido acético.	183
Tabla XI. Procedimiento de SPE de antioxidantes a partir de los simulantes A, B o C con acidificación previa de la muestra y adición de etanol.	184
Tabla XII. Condiciones finales del método analítico SPE-HPLC-UV.	189
Tabla XIII. Repetibilidad y límites de detección y cuantificación del método analítico SPE C <sub>18</sub> -HPLC-UV (n = 7) para una muestra ...	190
Tabla XIV. Límites de detección y cuantificación del método considerando una relación se volumen de simulante/superficie	192
Tabla XV. Recuperaciones obtenidas para la extracción LL de antioxidantes en una muestra de 4 g de aceite de oliva sobrecargada ...	195
Tabla XVI. Recuperaciones obtenidas para la extracción LL de antioxidantes en una muestra de 4 g de aceite de oliva sobrecargada ...	196
Tabla XVII. Repetibilidad del método LL-HPLC de extracción de antioxidantes en aceite de oliva (n= 4) para una disolución de 5 mg Kg <sup>-1</sup> .	197
<b>Capítulo VI. Determinación de antioxidantes en muestras de poliolefinas</b>	<b>211</b>
Tabla I. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación cromatográficos para los antioxidantes en diclorometano.	225
Tabla II. Factores y niveles utilizados en los diseños de experimentos.	228
Tabla III. Condiciones experimentales y cantidad de antioxidante extraído (µg g <sup>-1</sup> ) para el primer diseño compuesto central 2 <sup>3</sup> +star	233
Tabla IV. Condiciones experimentales y cantidad de antioxidante extraído (µg g <sup>-1</sup> ) para el segundo diseño compuesto central 2 <sup>2</sup> +star	235

---

Tabla V. Condiciones finales del método analítico mediante extracción con energía de microondas y determinación HPLC-UV...	237
Tabla VI. Precisión del método analítico para 2 g de muestra A extraída con 30 mL de diclorometano y límites de detección (LD) y .....	239
<b>Capítulo VII. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes A, B, C y D.....</b>	
Tabla I. Bibliografía revisada que determina la estabilidad de diferentes aditivos en simulantes de alimentos bajo las condiciones ...	252
Tabla II. Condiciones de tiempo y temperatura para los ensayos de migración [Directiva 82/711/CEE].	258
<b>Capítulo VIII. Estudio de composición y migración de muestras.....</b>	
Tabla I. Muestras seleccionadas para la determinación de antioxidantes.	285
Tabla II. Muestras de envases comerciales.	288
Tabla III. Comparación entre la concentración de antioxidantes en muestras y los niveles permitidos por la legislación.	289
Tabla IV. Muestras seleccionadas para el estudio de migración específica de antioxidantes.	292
Tabla V. Límites de detección y cuantificación para los métodos analíticos de migración específica, y límites de migración específica ...	293
Tabla VI. Resultados de ME en los cuatro simulantes A, B, C y D.	294
Tabla VII. Muestras seleccionadas para el estudio de migración específica de antioxidantes.	298
Tabla VIII. Contenido en antioxidantes de las muestras extruidas ...	299
Tabla IX. LME establecidos por la legislación , LD y LC de los métodos de ME para simulante acuoso y graso en bolsa sellada.	301
Tabla X. Resultados de ME en los cuatro simulantes A, B, C y D.	302



# Índice de acrónimos y símbolos utilizados

---

$\alpha$	Factor de selectividad
ACN	Acetonitrilo
ADI	( <i>Acceptable Daily Intake</i> ) Ingesta Diaria Aceptable
AO	Antioxidante
AO 2246	2, 2'-metilenbis (4-metil-6-terc-butilfenol)
AO 425	2, 2'-metilenbis (4-etil-6-terc-butilfenol)
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
BHA	Terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	2, 6 di-terc-butil-p-cresol
C <sub>18</sub>	Octadecilsilíce
CE, CEE	Comunidad Europea
CEN	Comité Europeo de Normalización
CFR	Código Federal de Regulaciones
CG	Cromatografía de Gases
CL	Cromatografía de Líquidos
CM	Cantidad máxima permitida de sustancia en el material u objeto
CV	Coeficiente de variación
D	Coeficiente de difusión del migrante
Da	Daltons
DAo	Coeficiente de difusión del aditivo en el polímero virgen
DAsw	Coeficiente de difusión del aditivo en el polímero totalmente hinchado
DBP	2, 4-di-terc-butil-fenol
ELSD	(Evaporative Light Scattering detector) Detector evaporativo de dispersión de luz
EM	Espectrometría de Masas
Ethanox 330	1, 3, 5-trimetil-2, 4, 6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno
FDA	( <i>Food and drug administration</i> ) Agencia reguladora de alimentos y medicamentos
FID	Detector de ionización de llama
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier



---

GRAS	Sustancias generalmente reconocidas como seguras
HALS	<i>(Hindered Amine Light Stabilizers)</i> Aminas impedidas estabilizadoras a la luz
HIPS	Poliestireno de alto impacto
HPLC	<i>(High Performance Liquid Chromatography)</i> Cromatografía de líquidos de alta eficacia
IR	Infrarrojo
Irgafos 168	Fosfito de tris(2, 4-diterc-butilfenilo)
Irganox 1010	Tetrakis[3-(3, 5-di-terc -butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol
Irganox 1076	3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo
K	Coeficiente de reparto del migrante entre el polímero y el simulante
k'	Factor de retención
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LD <sub>50</sub>	Dosis de ingestión que causa la muerte para el 50% de la población estudiada
LME	Límite de migración específica
LL	Líquido-líquido
M	Masa molecular
MAE	<i>(Microwave assisted extraction)</i> Extracción mediante energía de microondas
mbar	Milibar
MG	Migración global
MPPO	Óxido de polifenilo modificado
N	Número de platos teóricos
Nº CAS	Nº Chemical Abstract Service
ODS	Octadecilsílice
PA	Poliamida
PEAD	Polietileno de alta densidad
PEBD	Polietileno de baja densidad
PEBDL	Polietileno de baja densidad lineal

## Índice de acrónimos y símbolos utilizados

---

PET	Politereftalato de etileno
PLE	<i>(Pressurised liquid extraction)</i> Extracción presurizada de líquidos
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVC	Policloruro de vinilo
R	Coefficiente de correlación de Pearson Límite de reproducibilidad
r	Límite de repetibilidad
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
RMN-H <sup>+</sup>	Resonancia magnética nuclear de protón
Rs	Resolución
RSD	<i>(Relative Standard Deviation)</i> Error estándar relativo
S	Desviación estándar
SCF	Scientific Committee on Food
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
Tg	Temperatura de transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
US	Ultrasonidos
UV	Ultravioleta
XAD	Relleno polimérico de estireno divinilbenceno

***Capítulo I***  
***Introducción***

---

# Capítulo I. Introducción

---

<b>1</b>	<b>Uso de materiales plásticos como envases para alimentos .</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Empleo de aditivos en la formulación de envases de poliolefinas.....</b>	<b>8</b>
2.1	Clasificación de los aditivos y acción en la poliolefina	8
<b>3</b>	<b>Problemática del uso de aditivos .....</b>	<b>12</b>
3.1	Posibles causas de contaminación del alimento .....	12
3.2	Determinación de niveles de migración .....	14
3.3	Problemática en el control de la migración .....	15
3.4	Predicción de migración teórica de aditivos mediante la aplicación de modelos matemáticos. ....	17
<b>4</b>	<b>Características de los ensayos de migración .....</b>	<b>22</b>
4.1	Legislación europea y española .....	22
4.2	Legislación en Estados Unidos.....	27
4.3	Valores de los límites de migración global y límites de migración específica .....	28
4.4	Tipos de simulantes.....	29
4.5	Condiciones de contacto durante los ensayos de migración. ....	31
4.6	Determinación analítica de los niveles de migración global y migración específica .....	35
4.7	Ensayos de migración según el tipo de alimento.....	36



<b>5</b>	<b>Características de los antioxidantes.....</b>	<b>38</b>
5.1	Oxidación de las poliolefinas .....	38
5.2	Clasificación de los antioxidantes y mecanismos de acción en la poliolefina.....	41
5.3	Evolución en el uso de antioxidantes.....	47
5.4	Límites de migración establecidos por la legislación en los antioxidantes estudiados. ....	49
5.5	Toxicología de los antioxidantes estudiados .....	51
<b>6</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>55</b>

## **1 USO DE MATERIALES PLÁSTICOS COMO ENVASES PARA ALIMENTOS**

El uso de materiales poliméricos en el embalaje se remonta a los años 20 y 30 del siglo XX cuando empezaron a utilizarse polímeros naturales modificados, aunque la aparición de estos materiales fue incluso anterior, a finales del siglo XIX. En los años 50 se extendió el empleo de los materiales poliméricos sintéticos (materiales plásticos) para el embalaje: comenzaron a utilizarse bolsas y botellas de polietileno de baja densidad (PEBD) y en pocos años se fueron incorporando otros polímeros, tales como policloruro de vinilo (PVC), polipropileno (PP), poliamidas, poliésteres, etc., generalizándose su uso de tal manera que en la actualidad, en Europa, entre el 40 y 50% de todos los productos y materiales se envasan o embalan en materiales plásticos [Mateo, 2001].

Hoy en día, los envases plásticos suponen aproximadamente el 10% en masa de todos los materiales utilizados para el envasado. Este uso generalizado se debe principalmente a la mayor versatilidad de los materiales plásticos que ofrecen una gran variedad de envases frente a otro tipo de materiales, ya que desde su introducción se ha desarrollado una amplia gama de compuestos y estructuras con el fin de mejorar sus propiedades y aplicaciones. Entre sus ventajas, subrayar que resultan ligeros, relativamente baratos, fácilmente procesables y moldeables y como inconvenientes indicar su permeabilidad a gases y vapores y la posibilidad de interaccionar con el producto [Rodríguez Pin y col., 2003].

En España, al igual que en los demás países industrializados, el consumo de materiales plásticos se ha incrementado de forma significativa en los últimos años. En el gráfico de la figura 1 puede verse cómo en el plazo de los últimos 13 años, desde 1990 hasta el 2003, el consumo de materiales plásticos en España ha aumentado en la amplia variedad de sectores en que se utiliza, de tal manera que en el ámbito del envase y

embalaje, que es el destino de la mayor cantidad de materiales plásticos, su consumo se ha duplicado.

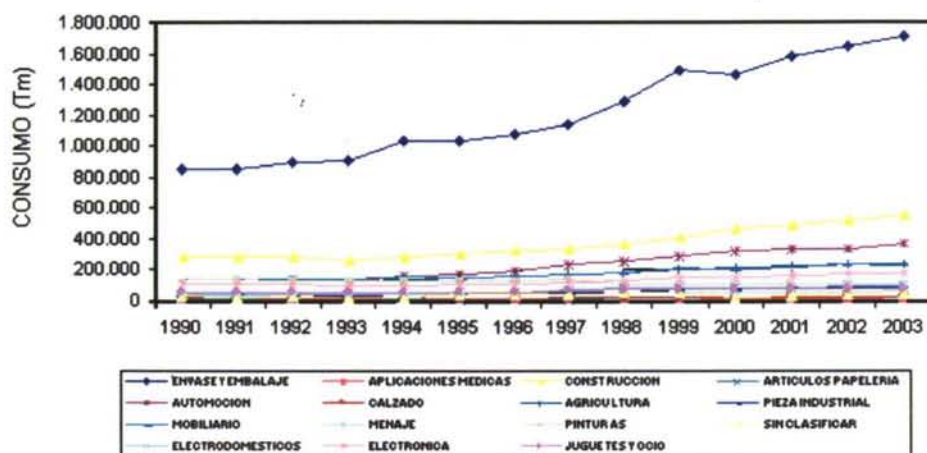


Figura 1. Evolución del consumo de los mercados de plásticos en España: 1990-2002 [Centro Español de plásticos, 2004].

La distribución de este consumo de los materiales plásticos en diferentes sectores puede verse con más claridad en la figura 2, en la que de nuevo se observa que el sector del envase y el embalaje constituye el principal mercado de los materiales plásticos ya que ha sido el destino del 45,0% de estos materiales en el año 2003 [Centro Español de Plásticos, 2004].

Dentro del sector de envase y embalaje, más de la mitad del total de la producción se destina a alimentación. Las poliolefinas, entre las que se encuentran el polietileno de baja densidad (PEBD), de baja densidad lineal (PEBDL), alta densidad (PEAD) y el polipropileno (PP), representan cerca del 75% del consumo total de materiales plásticos en el sector de envase y embalaje, tanto en España como en la mayoría de los países industrializados. Las razones principales de su amplio uso son su bajo precio, fácil procesabilidad, excelentes propiedades barrera frente a la humedad, capacidad de sellado a temperaturas relativamente bajas,

producción de films retráctiles y buena resistencia al impacto, mientras que entre sus desventajas cabría citar la alta permeabilidad a los gases, necesidad de tratamiento superficial para la impresión y decoración y la relativamente baja resistencia en alguna de sus propiedades mecánicas (rayado, rigidez...) [Mateo, 2001].

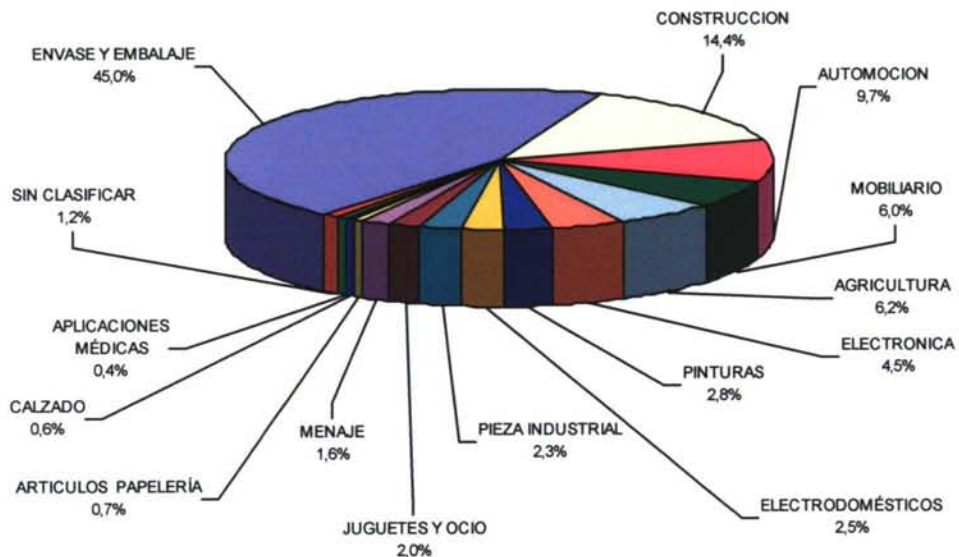


Figura 2. Participación de los mercados en el consumo estimado año 2003 [Centro Español de plásticos, 2004].

Al hablar de materiales plásticos o materiales poliméricos, cabe diferenciar entre *polímeros* y *plásticos*, los primeros son productos de base obtenidos por reacción química, que raras veces pueden utilizarse industrialmente mientras que los plásticos son aquellos polímeros, copolímeros o mezclas o injertos de los mismos a los que se han incorporado una serie de materiales auxiliares, *los aditivos*, que favorecen su transformación y uso posterior. También podrían considerarse aditivos muchos productos que intervienen en la formación del polímero, tales como catalizadores, inhibidores y otros materiales que se emplean para



coagular las dispersiones acuosas de los mismos, o para extraer los disolventes que se usan como medios [Capella, 2001].

## **2 EMPLEO DE ADITIVOS EN LA FORMULACIÓN DE ENVASES DE POLIOLEFINAS**

Hasta la actualidad se han desarrollado y utilizado una amplia variedad de aditivos con el fin de mejorar el comportamiento de los materiales de embalaje poliméricos, tanto durante el procesado y fabricación como en su posterior uso [Oi-Wah Lau y Siu-Kay Wong, 2000] por lo que en el siguiente epígrafe se enumeran los tipos de aditivos de uso más común en las formulaciones de poliolefinas así como su función en las mismas.

### **2.1 Clasificación de los aditivos y acción en la poliolefina**

- **Antioxidantes:** se emplean para inhibir las reacciones de termooxidación. De acuerdo con su forma de actuación pueden clasificarse en primarios, que se combinan con radicales libres o reaccionan con hidroperóxidos, generalmente son compuestos fenólicos estéricamente impedidos o aminas aromáticas, y secundarios, que impiden la oxidación por descomposición de los hidroperóxidos, suelen ser compuestos de tipo fosfito [Maier y Calafut, 1998].
- **Estabilizantes a la luz:** se emplean para evitar el deterioro de la poliolefina causado por la exposición a la luz ultravioleta (UV) que provocaría agrietamiento, decoloración, pérdida de brillo, transparencia y fragilidad [Maier y Calafut, 1998]. Estos aditivos pueden actuar absorbiendo la radiación ultravioleta (efecto pantalla) o bien desactivando rápidamente las especies radicales que se forman por

efecto de la radiación UV (desactivadores de estados excitados) [Gómez Antón y Gil Tercero, 1997]. En las poliolefinas los compuestos más comúnmente empleados son aminas poliméricas impedidas (HALS) [Oi-Wah Lau y Siu-Kay Wong, 2000].

- **Plastificantes:** se emplean para aumentar la flexibilidad y por tanto, la resistencia al impacto. Normalmente son productos de baja masa molecular [Hellerich y col., 1989] que incluyen compuestos como butilestearato, acetiltributylcitrate, alquilesebacatos y adipatos [Oi-Wah Lau y Siu-Kay Wong, 2000]. Entre todos, los ftalatos presentan el mayor consumo a nivel mundial aunque en los últimos años se está restringiendo su uso debido a la controversia sobre el potencial tóxico de estos compuestos [Garrigós y Reche, 2001].
- **Agentes antiestáticos:** proporcionan protección a las poliolefinas frente a las descargas electrostáticas, ya que al no ser conductoras de la electricidad, las cargas estáticas pueden acumularse en su superficie. Pueden ser aditivos iónicos, como el amonio cuaternario, sales de fosfonio o sulfonio, sales sódicas de sulfonatos, fosfatos y ácidos carboxílicos o aditivos no iónicos, como ésteres, ácidos grasos y aminas etoxiladas terciarias [Maier y Calafut, 1998].
- **Captadores de ácido (“acid scavengers”) o antiácidos:** se utilizan para neutralizar residuos ácidos catalíticos. Generalmente se emplean estearato de calcio y de zinc, que también pueden actuar como desmoldeantes o agentes “slip”; otros antiácidos incluyen zeolitas, óxidos de calcio y de zinc y sales metálicas de ácido láctico o benzoico [Maier y Calafut, 1998].
- **Desactivadores metálicos:** se utilizan ampliamente en las poliolefinas para desactivar los residuos metálicos presentes en la formulación procedentes de la catálisis, de impurezas que acompañan a los aditivos, o del contacto con el cobre en poliolefinas destinadas a aplicaciones de

cable o alambre. Actúan por quelación formando un complejo con las especies metálicas activas con lo que reducen su actividad catalítica. Son moléculas orgánicas que contienen heteroátomos (N, O, S, P) y/o grupos funcionales hidroxilo, carboxilo o carbamida que pueden reaccionar con el metal [Maier y Calafut, 1998].

- Agentes nucleantes: se añaden para mejorar las características del procesado, claridad, transparencia y modificar sus propiedades mecánicas. Los compuestos empleados incluyen sales de ácidos carboxílicos, bencilsorbitoles y sales de fosfatos orgánicos [Maier y Calafut, 1998].
- Retardadores de llama: se incorporan para alterar de alguna manera el proceso de combustión originado cuando hay un aporte importante de flujo térmico. Pueden actuar de diferentes maneras, inhibiendo la combustión de la fase gaseosa, alterando el mecanismo normal de degradación térmica al favorecer un proceso de baja energía que conduce a la carbonización o formando un recubrimiento protector aislante frente a la energía térmica. Son compuestos organoclorados, organofosforados, óxidos de antimonio o trihidrato de alúmina [Gómez Antón y Gil Tercero, 1997].
- Colorantes: como su nombre indica se incorporan para comunicarle color a la poliolefina. Pueden distinguirse entre tintes o pigmentos, los primeros son compuestos orgánicos solubles en el plástico, que aunque no resultan compatibles con las poliolefinas han sido utilizados en polipropileno orientado o entrecruzado. Los pigmentos no son solubles en el polímero por lo que además de color le confieren opacidad. Estos últimos pueden ser de naturaleza inorgánica, óxidos, sulfuros, cromatos y otros complejos basados en metales pesados; u orgánica, azocompuestos y otros compuestos químicos de estructuras variadas,



generalmente policíclicos, y con menos frecuencia forman complejos con metales [Maier y Calafut, 1998].

- Agentes “*antiblocking*”: evitan que los films de plástico se peguen unos a otros debido al frío o a la electricidad estática. Incluyen ceras naturales y manufacturadas, sales metálicas de ácidos grasos, compuestos de sílice o polímeros tales como alcohol de polivinilo, poliamidas, polietileno, polisiloxanos y fluoroplásticos [Maier y Calafut, 1998].
- Lubricantes: se utilizan en el procesado de plásticos para disminuir la viscosidad de flujo o evitar que el polímero se pegue a superficies metálicas. Las poliolefinas se procesan más fácilmente que otros polímeros y generalmente requieren poco o ningún lubricante. Con frecuencia se utilizan estearatos de calcio, de zinc o ceras de polietileno [Maier y Calafut, 1998].
- Agentes “*slip*”: son compuestos que tienden a aflorar gradualmente hacia la superficie del plástico donde aportan propiedades útiles, que incluyen la lubricación para impedir que los films se peguen unos a otros y la reducción de la carga estática. Generalmente se emplean amidas de ácidos grasos [Oi-Wah Lau y Siu-Kay Wong, 2000].
- Agentes espumantes o de soplado: son líquidos o sólidos cuya función es formar un gas durante el procesado del polímero para disminuir la densidad del polímero y reducir costes de materiales. De acuerdo con su forma de generar el gas pueden ser clasificados en agentes químicos o físicos. Los últimos citados son gases comprimidos, como nitrógeno, o menos empleados como líquidos volátiles, hidrocarburos alifáticos fluorados y clorados de cadena corta (CFCs), ahora en desuso. Los agentes químicos pueden ser compuestos inorgánicos como bicarbonato sódico, borohidruro sódico, ácido policarbónico y ácido cítrico o



compuestos orgánicos como los derivados de la hidrazina [Maier y Calafut, 1998].

### 3 PROBLEMÁTICA DEL USO DE ADITIVOS

#### 3.1 Posibles causas de contaminación del alimento

El envasado de alimentos tiene entre otras la función de protegerlo frente a la contaminación externa aunque hay que considerar que el envase plástico por sí mismo no resulta completamente inerte [Tice y Cooper, 1994] sino que se pueden llegar a producir varios tipos de interacción en los que intervienen el objeto plástico, el alimento y el entorno [Bejarano, 2001]:

- Adsorción/absorción de componentes del alimento por parte del objeto de plástico. Esta interacción, podría suponer un grave problema si el alimento llegase a alterar el envase de plástico, de tal manera que éste no llegase a cumplir su función correctamente, pero generalmente se soluciona sustituyéndolo por otro más adecuado.
- Permeación del entorno al alimento (o viceversa) a través del plástico. Se trata de un fenómeno sin demasiada relevancia, ya que en condiciones normales se previene tanto el paso de agentes externos (gases y vapores, luz, etc.) al alimento como la pérdida de propiedades del producto alimenticio (sabor, color, olor...) mediante la elección de un material apropiado.
- Migración de sustancias desde el producto plástico al alimento. Si se produce una pérdida física de aditivos u otras sustancias residuales procedentes del envase plástico durante su uso, se estaría causando la contaminación del producto alimenticio con la posible alteración de sus

propiedades organolépticas y/o su toxicidad. Por lo tanto, este fenómeno de migración es el de mayor relevancia entre los tres tipos de interacción considerados, y de hecho, es el único que está controlado por la legislación porque implica el riesgo potencial de comercializar alimentos tóxicos.

La velocidad de pérdida de los aditivos u otras sustancias migrantes potenciales depende de su compatibilidad con el polímero y va a estar controlada por su movilidad, extractabilidad y solubilidad de manera que las etapas de la migración de una sustancia en el polímero pueden definirse como [Haider y Karlsson, 2000]:

- I. Pérdida de la sustancia controlada por desorción desde la superficie del material polimérico.
- II. Etapa intermedia donde tienen importancia desorción y difusión.
- III. Pérdida controlada por difusión dentro del material polimérico.

La desorción a partir de la superficie de la muestra, que está determinada por la movilidad del compuesto químico y su solubilidad en el polímero, sólo influye realmente en el proceso de migración en matrices poliméricas muy finas y de alta concentración superficial del migrante potencial. Por lo tanto, la migración está definida fundamentalmente por la velocidad de difusión del aditivo dentro del polímero que se ve afectada principalmente por tres factores, el tamaño de la molécula que difunde, la interacción entre esta molécula y la matriz polimérica y el volumen libre del polímero en la región amorfa [Haider y Karlsson, 2000]. En relación a las poliolefinas, polímeros semicristalinos, este fenómeno de difusión queda prácticamente restringido a la región amorfa, que representa el 30-60% del total [Limm y Hollifield, 1996] y en la que se pueden disolver los

potenciales migrantes [Haider y Karlsson, 2000] mientras que las regiones cristalinas ocuyen a estos compuestos resultando inaccesibles para procesos de migración.

### 3.2 Determinación de niveles de migración

La legislación europea establece limitaciones para las sustancias con el potencial de migrar desde los envases plásticos al alimento, con el objetivo último de proteger al consumidor, controlando el nivel de sustancias no deseadas en los alimentos. Para ello existen dos mecanismos: por una parte el *límite de migración global* para el total de adulterantes, que pueden migrar del plástico al alimento y por otra las restricciones específicas para sustancias individuales de acuerdo con su toxicidad mediante los *límites de migración específicos (LME)* [Ashby, 1997a], que se entienden como:

- Límite de migración global: cantidad máxima de sustancias que puede ceder el material plástico al alimento. Este valor no tiene en cuenta ni la identidad ni la toxicidad de los compuestos que migran.
- Límite de migración específica (LME): cantidad máxima de una sustancia determinada que puede ser cedida por el plástico al alimento. Este valor se ha fijado considerando su potencial tóxico.

La determinación de los niveles de migración de la materia plástica, tanto globales como específicos se realiza mediante *ensayos de migración* en los que se pone en contacto la muestra de materia plástica con el producto alimenticio o el simulante apropiado, de forma equivalente a las condiciones de uso reales durante un período de tiempo y a una temperatura seleccionados en relación a las peores condiciones de contacto previsibles en su uso real [Directivas 82/711/CEE y 85/572/CEE]. Al final del tiempo prescrito, se lleva a cabo la determinación analítica de la cantidad total de sustancia (migración global) y/o de la cantidad específica



de una o más sustancias (migración específica) liberadas por la muestra sobre el producto alimenticio o el simulante [Directiva 2002/72/CE].

### **3.3 Problemática en el control de la migración**

En la práctica, el control de la migración a partir de sustancias plásticas se encuentra con una serie de dificultades que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Aunque los compuestos con mayor riesgo potencial de migración son principalmente los aditivos o sus productos de descomposición, de masa molecular lo suficientemente baja para moverse por difusión en la red polimérica [Petersen, 2003], resulta difícil establecer para cada material en concreto, qué posibles migrantes se deben controlar, porque generalmente no se dispone de la información composicional del embalaje [Feigenbaum y col., 2002; Petersen, 2003].
- Aquellos que manufacturan y venden resinas no tienen control sobre la composición final, las condiciones de procesado o la aplicación final, es decir con qué tipo de alimento entrará en contacto el material plástico [Feigenbaum y col., 2002].
- La determinación de los niveles de migración directamente en alimentos exige metodologías analíticas complejas y no siempre se dispone de los métodos adecuados, aún estando identificados los posibles migrantes. Por este motivo, la legislación permite el uso de “simulantes de alimentos”, medios que imitan el comportamiento de los alimentos en los que resulta más sencillo llevar a cabo los análisis, aunque incluso usando estos simulantes, especialmente con el simulante graso, aceite de oliva, resulta muy difícil analizar niveles bajos de contaminantes químicos [Feigenbaum y col., 2002].
- Teniendo en cuenta la dificultad que presenta, en algunos casos, la determinación de la migración específica, se ha propuesto una forma



alternativa de controlar la migración de aditivo que se basa en calcular la concentración teórica de aditivo que podría migrar al alimento. Para ello es necesario:

- Determinar la concentración del migrante en el material plástico, en nuestro caso antioxidantes en poliolefinas, con la problemática que ello conlleva debido principalmente a la alta reactividad y baja estabilidad que caracteriza a la mayoría de los antioxidantes, las bajas concentraciones que presentan en el material y la insolubilidad de la matriz polimérica [Thilén y Shishoo., 2000].
- Estimación de la concentración teórica que podría migrar al alimento mediante dos posibles procedimientos: suponiendo una migración del 100 % del aditivo, o de otra forma más próxima a la realidad, aplicando un modelo matemático que defina la transferencia de masa que se produce en el sistema considerando que la masa migrada es función de la concentración inicial, su situación en el polímero, el tiempo de contacto y las características del sistema [Catalá y Gavara, 2002] aunque esta alternativa presenta la problemática de modelizar la transferencia del aditivo.

Si el valor de migración teórico no sobrepasa el LME establecido por la legislación, no es necesario llevar a cabo el ensayo de migración (figura 3).

Para facilitar introducir el control de la migración como una práctica de rutina se han propuesto guías del procedimiento a seguir tanto en la industria como en los laboratorios de control. En la figura 3 se muestra la guía propuesta para los laboratorios oficiales en el proyecto europeo llevado a cabo por Scholler y col. (2003).

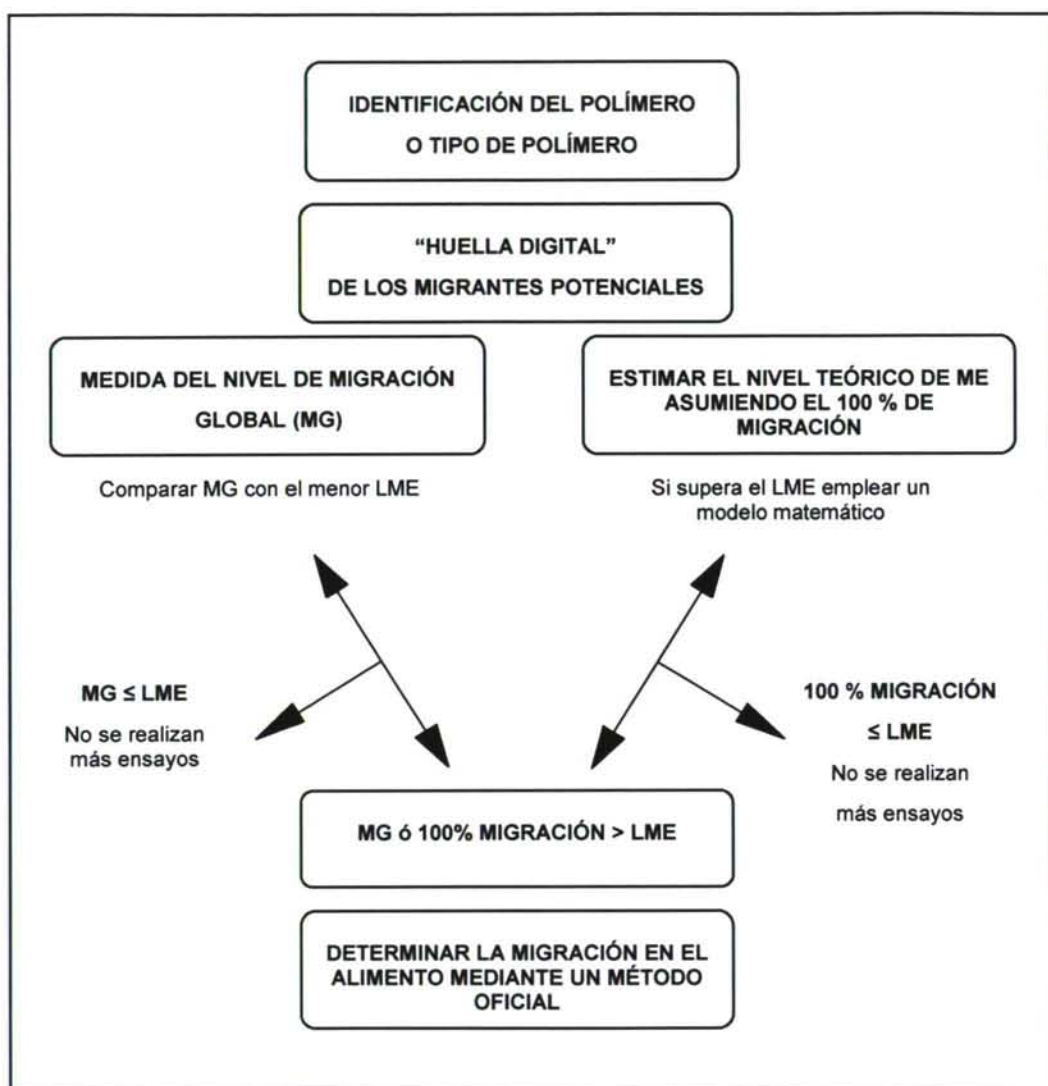


Figura 3. Propuesta de metodología a seguir por los laboratorios oficiales para controlar si un material polimérico cumple la legislación [Scholler y col., 2003].

### 3.4 Predicción de migración teórica de aditivos mediante la aplicación de modelos matemáticos

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos que han desarrollado, mejorado y validado diferentes modelos matemáticos

para calcular la migración teórica de una sustancia a partir de un polímero, alcanzando un grado de concordancia tal que ésta resulte igual o en todo caso superior al nivel de migración real. Estos estudios se basan en determinar qué variables intervienen en el proceso de migración y con qué importancia, de manera que tanto la complejidad como la efectividad de los modelos vienen dadas por las variables consideradas y las hipótesis que asumen.

Los modelos matemáticos más sencillos resuelven de forma analítica la ley de difusión de Fick considerando como parámetros más importantes para estimar la migración, el coeficiente de difusión ( $D$ ) del migrante en el polímero y el coeficiente de reparto ( $K$ ) del migrante entre el polímero y el simulante [Baner y col., 1992].

Se han propuesto diferentes modelos que han sido posteriormente discutidos y perfeccionados, por ejemplo, la solución dada por Crank en 1975 constituye el punto de partida de un modelo más sencillo desarrollado por Baner, Piringer y colaboradores [Baner y col., 1992, 1994a, 1996] que establece una relación empírica del coeficiente de difusión,  $D$ , con la masa molecular del aditivo, el tipo de polímero y la temperatura. Limm y Hoffield (1996) desarrollaron un modelo semiempírico (“modelo de difusión de la FDA”) en el que consideran que los factores que influyen en el proceso de difusión pueden ser: característicos del polímero (tales como su morfología y cristalinidad); propios del aditivo (tamaño, forma y densidad); relacionados con la interacción del polímero y el aditivo (efecto de plastificación) y relacionados con la temperatura, temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y temperatura de fluidez del polímero. Para poder aplicar el modelo con mayor facilidad realizan simplificaciones, que asumen que durante la migración no tiene lugar un reparto del aditivo entre el plástico y el alimento.



La aplicación de este tipo de modelos a la migración específica de aditivos a partir de poliolefinas [O'Brien y col., 1997, 1999] pone de manifiesto que aunque resultan válidos para determinadas variables, para un tipo de aditivo, polímero y condiciones de ensayo, necesitan ser perfeccionados para poder ser utilizados de una forma más general, ya que dependiendo del modelo empleado pueden tender a sobreestimar o infraestimar el nivel de migración (Figura 4).

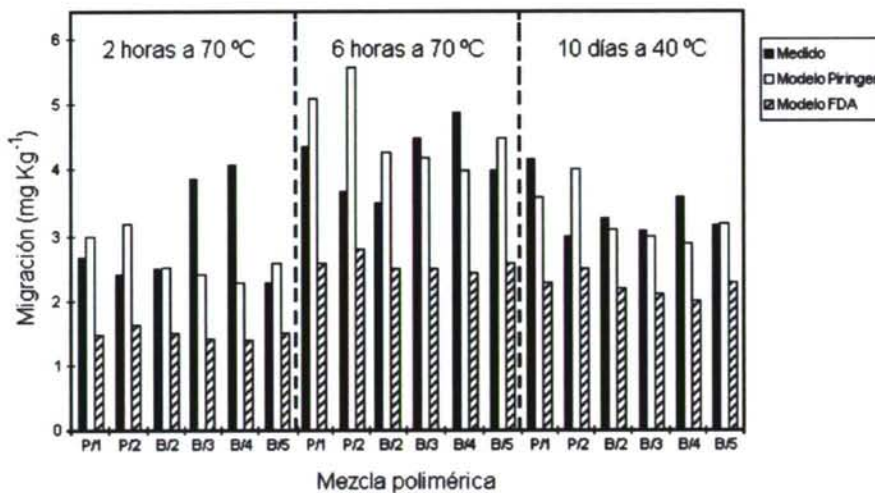


Figura 4. Comparación de los resultados teóricos y experimentales de migración específica para el aditivo Irganox 1076 en aceite de oliva [O'Brien y col., 1999].

Chung y col. (2002) propusieron como alternativa un modelo sencillo de migración que también tiene como punto de partida las ecuaciones de Crank, en el que introducen un término que considera el efecto del reparto en la migración. Realizan un estudio teórico del error asociado a la estimación del coeficiente de difusión para el modelo propuesto, en el que tienen en cuenta tanto el embalaje como el alimento finitos, de forma más cercana al caso real, obteniendo mejores resultados frente a modelos utilizados habitualmente en los que se considera el alimento infinito y el embalaje finito.



Por otra parte, se han llevado a cabo estudios para determinar la influencia en la migración de variables que no se habían introducido en los modelos matemáticos, como el tipo de disolvente de contacto [Chang, 1982; Garde y col., 2001; Helmroth y col., 2002; Reynier y col., 2001] que en función de sus propiedades, polaridad, tamaño molecular y forma, puede tener una gran importancia en la velocidad de migración, ya que las propiedades del disolvente condicionan que este sea absorbido por el polímero en mayor o menor medida de manera que, durante la migración, el alimento o simulante puedan penetrar en el polímero e hincharlo [Reynier y col., 2002a] y cuanto mayor es la absorción de disolvente, mayor es el coeficiente de difusión de una sustancia en el polímero, siendo este efecto más importante para los compuestos de alta masa molecular (figura 5).

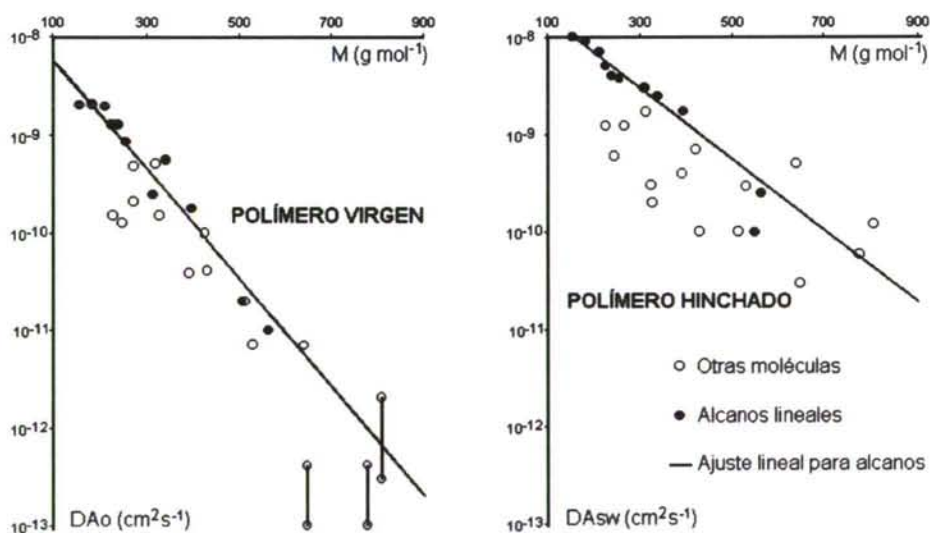


Figura 5. Coeficientes de difusión en polipropileno virgen e hinchado a 40 °C (hinchado por gliceril triperlargonato) [Reynier y col., 2002a].

La introducción de nuevas variables para explicar el comportamiento de los migrantes aumenta la complejidad de los modelos

matemáticos de tal manera que ya no es posible resolver la ecuación de Fick de forma analítica, sino que se precisan resoluciones numéricas de la misma [Brandsch y col., 2002; Reynier y col., 2002a, b]. Para disminuir en lo posible la dificultad de los cálculos con el fin de estimar la migración teórica, mediante la aplicación de modelos matemáticos, en los últimos años se han publicado diferentes trabajos en los que se proponen y validan programas informáticos, como los que se citan a continuación:

- Programa “Migratest lite” que perfecciona el modelo desarrollado por Piringer y Baner [Brandsch y col., 2002], cuya validez fue estudiada por O’Brien y col. (1999) y O’Brien y Cooper (2001, 2002).
- Programa desarrollado por Reynier y col. (2002a, b). En este programa se emplea un modelo matemático global en el que se consideran los efectos de hinchado causados por el disolvente en la migración a partir de los polímeros, las limitaciones cinéticas en la superficie del polímero a la transferencia de masa y el coeficiente de partición, calculando los coeficiente de difusión utilizando el modelo Piringer. Se puede descargar gratuitamente de la página web del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) <http://www.inra.fr/Internet/Produits/securite-emballage>.
- Programa que emplea un método de elementos finitos (FEM) para la simulación de la migración de aditivos a partir de un embalaje multicapa, considerando la ecuación de Arrhenius y el modelo Piringer para estimar los coeficientes de difusión [Roduit y col., 2004].

Como conclusión, estos modelos matemáticos representan una herramienta útil para la industria en el control de los materiales terminados reduciendo el número de ensayos de migración, que siguen teniendo que realizar si los resultados obtenidos superan los límites establecidos por la legislación. Sin embargo, la evolución en el desarrollo de estos métodos refleja la gran complejidad que supone obtener un

modelo matemático adecuado para cualquier tipo de material y condiciones, por lo que en la actualidad se siguen perfeccionando y validando.

## **4 CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS DE MIGRACIÓN**

### **4.1 Legislación europea y española**

La legislación europea con la Directiva del Consejo 89/109/CEE, sustituida recientemente por el Reglamento 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, establece los aspectos generales sobre la regulación de todos los materiales y artículos destinados a entrar en contacto con alimentos, mientras que las regulaciones para cada material en concreto se han ido estableciendo en directivas específicas para plásticos, celulosa regenerada, elastómeros y gomas, papel y cartón, material cerámico, vidrios, metales y aleaciones, madera incluyendo corcho, productos textiles, ceras parafínicas y ceras microcristalinas [Shorten, 1997].

A nivel europeo, estas directivas específicas para los materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos regulan por una parte la composición de la materia plástica y por otra establecen un límite máximo para la posible migración desde el envase, como producto acabado, al alimento. Dicha legislación específica sobre materiales plásticos está recogida actualmente en la Directiva 2002/72/CE (recopilación de regulaciones más antiguas para facilitar su consulta) que se centra en las restricciones y especificaciones que deben cumplir los materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos y en las Directivas técnicas 85/572/CEE y 82/711/CEE que establecen las condiciones experimentales de contacto que deben cumplir los ensayos de migración. Estas tres directivas con sus posteriores modificaciones han sido refundidas en la legislación española, Real Decreto 118/2003.



Por otra parte, la legislación europea recomienda determinados métodos analíticos para llevar a cabo tanto los ensayos de migración global como específica que están recogidos en las normas europeas EN 1186 y ENV 13130, respectivamente. En España recibieron el rango de norma nacional mediante la publicación de una versión en español de las mismas, UNE-EN 1186 y UNE-ENV 13130, elaborada por el Comité Técnico AEN/CTN 53 Plásticos y Caucho.

A continuación se resume el contenido de estas regulaciones europeas y españolas para el material plástico en contacto con alimentos actualmente en vigor, y para facilitar su comprensión se incluye también un listado de las mismas en la tabla I.

Los puntos más importantes que recoge la *Directiva 2002/72/CE*, que regula las condiciones que deben cumplir los materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos son:

- Establece el valor “límite de migración global”, que define la máxima cantidad de componentes que los materiales y objetos plásticos pueden ceder a los productos alimenticios.
- Incluye un listado de monómeros y otras sustancias de partida que pueden ser utilizados en la fabricación de materiales y objetos plásticos junto con las restricciones o especificaciones sobre su utilización. Este listado está dividido en dos secciones, A y B, los productos recogidos en esta última están a la espera de su evaluación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para poder ser incluidos en la sección A.
- Incluye un listado de aditivos que pueden utilizarse en la fabricación de los materiales y objetos plásticos acompañado de las restricciones o especificaciones sobre su utilización. Está dividido en dos secciones, A y B, indicándose que para los aditivos incluidos en la sección B su análisis en el simulante D o



medios sustitutivos no resulta obligatorio hasta el 1 de julio de 2006. Esta lista se considera incompleta y hasta finales del 2007 no se establecerá la fecha para considerarla como una lista positiva.

Tabla I. Legislación sobre migración actualmente en vigor.

COMPOSICIÓN DEL MATERIAL PLÁSTICO. LÍMITES DE MIGRACIÓN			
	Deroga a	Modificada por	Contenido
EUROPEA	Directiva 2002/72/CE	Directiva 90/128/CEE y modificaciones-refundición	Directiva 2004/1/CE Directiva 2004/19/CE Rectificación DO L 39 de 13/02/2003
	Directiva 82/711/CEE	Directiva 93/8/CEE Directiva 97/48/CE	
	Directiva 85/572/CEE		
ESPAÑOLA	Real Decreto 118/2003	Real Decreto 2207/1994 y modificaciones-refundición	Rectificación RCL2004\1228
CONDICIONES DE ENSAYOS EXPERIMENTALES			
	Deroga a	Modificada por	Contenido
EUROPEA Y ESPAÑOLA	UNE-EN 1186:2002 Partes 1 a 15	UNE-53330-83	Parte 1: guía para la selección de las condiciones de los ensayos de MG. Partes 2-15: diferentes condiciones y métodos de ensayo que pueden ser utilizados para llevar a cabo los ensayos de MG.
	UNE-ENV 13130 (provisional)		Parte 1: guía para la selección de las condiciones de los ensayos de ME. Partes 2-28: métodos analíticos para determinar los niveles de ME de algunos monómeros y aditivos.

- Regula la migración específica tanto de los monómeros y otras sustancias de partida como de los aditivos a través de sus restricciones y especificaciones en las que se incluyen:
  - El límite de migración específica de una sustancia en el alimento o simulante de alimento (LME).
  - La cantidad máxima permitida de sustancia en el material u objeto (CM).

aunque para la gran mayoría fijan el primero, LME.

Esta Directiva 2002/72/CE está pendiente de futuras modificaciones con el objeto de añadir compuestos a las listas de monómeros y aditivos cuando hayan sido toxicológicamente ensayados y establecidas las restricciones sobre su empleo. La introducción de un nuevo aditivo en estas listas precisa de un estudio previo regulado a través de las Directrices de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [Note for guidance for food contact materials, 2003] cuyas especificaciones son especialmente estrictas para los compuestos con una masa molecular por debajo de 1000 Daltons.

La *Directiva 82/711/CEE* y posteriores modificaciones, establecen las condiciones en las que deben realizarse los ensayos de migración tanto específica como global. A continuación se recogen los puntos principales que fija la norma:

- Los simulantes de alimentos, acuosos y grasos, que pueden emplearse en lugar de los alimentos, aclarándose que no siempre es posible utilizarlos para realizar los ensayos de migración. También se incluyen los criterios para seleccionar estos simulantes en función de los alimentos con los que vaya a entrar en contacto el material plástico en su uso.

- Las condiciones convencionales de tiempo y temperatura en las que se deben realizar los ensayos de migración con simulantes de acuerdo con el tiempo y temperatura reales que se prevea que vayan a estar en contacto los materiales plásticos con los productos alimenticios teniendo en cuenta siempre las peores condiciones previstas en el empleo del material en las aplicaciones prácticas.
- Las condiciones convencionales para los ensayos sustitutivos, si no es posible por razones técnicas, llevar a cabo las condiciones de ensayo generales relativas al simulante graso.

La *Directiva 85/572 EEC* complementa a la normativa anterior en lo relativo a las condiciones de ensayo:

- Cita de nuevo la lista de simulantes que pueden emplearse en los ensayos de migración.
- Enumera todos los grupos de productos alimenticios y les asigna uno o varios simulantes para realizar los ensayos de migración.
- Establece coeficientes de reducción para corregir la mayor capacidad de extracción del simulante graso comparado con determinados productos alimenticios de manera que el resultado del ensayo de migración debe dividirse por la cifra indicada.

Las normas europeas *EN 1186* y *ENV 13130* describen los procedimientos para la determinación de la migración global y específica, respectivamente. Fueron elaboradas por el Comité Técnico CEN/TC 194, Comité científico 1, relativo a “Métodos químicos generales de ensayo para materiales destinados a entrar en contacto con alimentos” [Petersen, 2003] perteneciente a la Comisión Europea de Normalización (CEN), que tiene por objetivo el desarrollo de métodos analíticos en apoyo de las Directivas citadas anteriormente.



Las versiones oficiales en español de estas normas que están en diferente fase de elaboración, son la *UNE-EN 1186* y la *UNE-ENV 13130*. Mientras que la norma UNE-EN 1186 dispone ya de 15 partes donde se recogen diferentes casos de ensayos de migración global, la norma UNE-ENV 13130 es provisional. Se han publicado en español las secciones UNE-ENV 13130-1 a UNE-ENV 13130-8, y las otras secciones están siendo elaboradas como proyectos del CEN/TC 194 (prCEN/TS 13130-9 a prCEN/TS 13130-28), todas ellas relacionadas con la determinación de la migración específica de materiales plásticos a alimentos y simulantes de alimentos y la determinación de monómeros y aditivos específicos en plásticos.

## 4.2 Legislación en Estados Unidos

En Estados Unidos, las regulaciones relativas a materiales en contacto con alimentos son competencia de la FDA (Agencia reguladora de medicamentos y alimentos) y recogidas en el *Title 21. Food and drugs* del Código Federal de Regulaciones (CFR) [Kuznesof, 2002]. Esta legislación difiere de la europea, tanto en la forma de control de los diferentes tipos de polímeros que pueden ser utilizados para elaborar los materiales plásticos, como en las condiciones requeridas para los ensayos de migración, y los cálculos numéricos para determinar los niveles de exposición en la dieta humana [Ashby, 1997b].

Para las poliolefinas, al igual que para otros polímeros que se pueden utilizar como artículos o componentes de artículos destinados a entrar en contacto con alimentos se incluyen los valores de diferentes parámetros físicos y químicos. Se indica qué propiedades deben cumplir para poder ser empleadas de forma segura así como un listado de los adyuvantes que pueden ser utilizados en su fabricación con sus correspondientes limitaciones. Otras sustancias que también pueden incorporarse a las formulaciones de las poliolefinas destinadas al contacto con alimentos, son recogidas en otros apartados de la legislación: aditivos



indirectos de alimentos permitidos para su uso en embalajes; sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) para su uso en alimentos y que también están permitidas en embalajes de alimentos, a menos que se haya establecido una restricción específica o prohibición y sustancias establecidas como GRAS para uso en embalaje de alimentos. Para facilitar su consulta, todas las sustancias que pueden ser utilizados en materiales en contacto con alimentos están recogidas en una lista de aditivos “indirectos” [FDA, Lista de aditivos indirectos, 2004].

Cuando se quiere introducir un nuevo compuesto para que sea regulado como aditivo indirecto, debe presentarse una petición en la que recojan los resultados de los ensayos de migración realizados (similares a los establecidos en la legislación europea) y los cálculos para determinar los niveles de exposición en la dieta humana [FDA, Guidance for industry, 2002].

#### **4.3 Valores de los límites de migración global y límites de migración específica**

La migración global de la materia plástica se controla de acuerdo con la legislación europea (Directiva 2002/72/CE) mediante el *límite de migración global* que se expresa como:

*10 mg por decímetro de superficie del material u objeto* que también puede ser expresado como *60 mg por Kg de producto alimenticio* en determinados casos.

Los niveles de *migración específica* para aditivos y monómeros u otras sustancias de partida, como se ha indicado pueden ser controlados por dos valores de referencia [Directiva 2002/72/CE]: el límite de migración específica (LME) en alimentos o simulantes alimenticios, o la cantidad máxima permitida de sustancia residual en el material u objeto (CM), ya que en ciertas condiciones resulta más sencillo determinar la

cantidad de una sustancia en un material u objeto terminado, que su nivel de migración específica.

Los LME para monómeros y aditivos están expresados de manera genérica como mg por Kg de simulante, aunque también pueden expresarse en mg por dm<sup>2</sup> de superficie plástica en determinados casos, mientras que las CM se expresan siempre como mg por dm<sup>2</sup> de superficie plástica.

#### **4.4 Tipos de simulantes**

La determinación de los niveles de migración tanto global como específica directamente en los alimentos, conlleva una serie de dificultades analíticas, en función de las características de la matriz. Aunque la tendencia es la determinación directa en el alimento y existen trabajos de investigación en esta línea, que analizan directamente los niveles de migración en alimentos [Hashizume y col., 1988; Jickells y col., 1993; Schwöpe y col., 1987a, b y Till y col., 1982], la legislación europea permite la sustitución del alimento por un simulante para realizar ensayos de migración, lo que simplifica el procedimiento analítico.

El material plástico produce sobre estos simulantes de alimentos un efecto similar al que producirían sobre el alimento con el que estuviesen en contacto, ya que se reproducen en la medida de lo posible los fenómenos de interacción que pueden resultar del contacto materia plástica-alimento.

La legislación europea [Directiva 82/711/CEE] permite el uso de cuatro simulantes, tres de ellos acuosos, los simulantes A, B y C y uno graso, el simulante D:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.
- Simulante B: ácido acético al 3% (p/v).
- Simulante C: etanol al 10% (v/v). La graduación alcohólica de este simulante debe aumentarse cuando la graduación real del alimento es

superior al 10%, para que ambas coincidan.

- Simulante D: aceite de oliva rectificado que puede ser sustituido por una mezcla sintética de triglicéridos o de aceite de girasol o de maíz con especificaciones normalizadas, aunque si con estos sustitutos se sobrepasan los límites de la migración sigue siendo necesario realizar el ensayo con aceite de oliva.

Los ensayos de migración con simulante D son los que presentan mayores dificultades analíticas debido a que un gran número de los migrantes son sustancias lipofílicas poco volátiles que se encuentran a bajos niveles en la matriz grasa. Por otra parte, los niveles de migración en la materia grasa son generalmente mucho mayores que en los simulantes acuosos [O'Brien y col., 1999]. Por este motivo, cuando por cuestiones técnicas relacionadas con el método de análisis, no resulta factible emplear los simulantes de alimentos grasos citados anteriormente, existe la posibilidad de llevar a cabo ensayos sustitutivos de materias grasas para la migración global y específica empleando isooctano, etanol al 95% u óxido de polifenilo modificado (MPPO) [Directiva 82/711/CEE].

El uso de estos simulantes alternativos que ha sido estudiado experimentalmente en diferentes trabajos como los de Alnafouri y Franz (1999), Baner y col. (1994b), Cooper y col. (1998), De Kruijf y Rijk (1988) y Métois y col. (1998), presenta también ciertos inconvenientes ya que en función de las características del polímero (naturaleza y espesor) unos simulantes pueden resultar más adecuados que otros, y los resultados a los que se llega en estudios diferentes no siempre coinciden, siendo en algún caso contradictorios. Así por ejemplo, el uso de etanol al 95% como simulante graso permite obtener a Cooper y col. (1998) unos resultados de migración específica en poliolefinas similares a los conseguidos con aceite de oliva mientras que este simulante es descartado por Alnafouri y Franz (1999) para los ensayos de migración tanto global como específica en



muestras de polipropileno. Por otra parte, incluso cuando se usan estos simulantes alternativos, resulta necesario un gran número de ensayos de migración [O'Brien y col., 1999].

#### **4.5 Condiciones de contacto durante los ensayos de migración**

Los ensayos de migración se basan, como se ha comentado anteriormente, en poner en contacto el material plástico con el producto alimenticio en unas determinadas condiciones de tiempo y temperatura que son fijadas por la Directiva 82/711/CEE, mientras que la forma en que se realiza este contacto está regulado por las normas UNE-EN 1186 y UNE-ENV 13130.

Tal como puede verse en la tabla II, la Directiva 82/711/CEE asigna unas condiciones de tiempo y temperatura para el contacto entre el material plástico y el simulante durante el ensayo de migración de acuerdo con las condiciones de contacto real que se produzcan entre el material plástico y el alimento.

La selección de las condiciones para el ensayo de migración debe realizarse considerando las peores condiciones previsibles que podrían tener lugar en el contacto real.

Las normas UNE-ENV 13130 para migración global y UNE-EN 1186 para migración específica establecen los procedimientos para el contacto entre la materia plástica y el simulante, que son muy similares en ambos tipos de ensayos.

La única diferencia en el contacto durante los ensayos de migración global y específica está en la relación superficie de contacto/volumen de simulante recomendada (tabla III). A continuación se recoge una síntesis de los procedimientos alternativos propuestos en estas normas, en los que el contacto con el simulante puede tener lugar con una o ambas superficies de la muestra plástica.



Tabla II. Condiciones de tiempo y temperatura para los ensayos de migración [Directiva 82/711/CEE].

CONDICIONES DE CONTACTO EN LAS PEORES CONDICIONES DE USO PREVISIBLES	CONDICIONES DE ENSAYO
Duración del contacto	Duración del ensayo
5 minutos < t ≤ 0,5 horas	0,5 horas
0,5 horas < t ≤ 1 hora	1 hora
1 hora < t ≤ 2 horas	2 horas
2 horas < t ≤ 4 horas	4 horas
4 horas < t ≤ 24 horas	24 horas
t > 24 horas	10 días
Temperatura de contacto	Temperatura del ensayo
T ≤ 5 °C	5 °C
5 °C < T ≤ 20 °C	20 °C
20 °C < T ≤ 40 °C	40 °C
40 °C < T ≤ 70 °C	70 °C
70 °C < T ≤ 100 °C	100 °C o temperatura de reflujo
100 °C < T ≤ 121 °C	121 °C
121 °C < T ≤ 130 °C	130 °C
130 °C < T ≤ 150 °C	150 °C
T > 150 °C	175 °C

Tabla III. Condiciones de contacto entre la muestra y el simulante en los ensayos de migración [UNE-ENV 13130-1 y UNE-EN 1186].

	SUPERFICIE MUESTRA - VOLUMEN SIMULANTE	
	Migración global	Migración específica
Inmersión total	1 dm <sup>2</sup> - 100 mL	6 dm <sup>2</sup> - 1000 mL
Celda normalizada	2,5 dm <sup>2</sup> - 125 mL	6 dm <sup>2</sup> - 1000 mL
Bolsa normalizada	2 dm <sup>2</sup> - 100 mL	2 dm <sup>2</sup> - 100 mL
Bolsa vuelta	2 dm <sup>2</sup> - 100 mL	6 dm <sup>2</sup> - 1000 mL

*Ensayo con contacto del material por ambas caras con el simulante:*

- Mediante la inmersión total de la muestra: las láminas de plástico se colocan en un soporte (figura 6) de manera que ambas caras del material, tanto la externa como la interna están en contacto con el simulante, por lo que resulta bastante severo y no reproduce la mayoría de los casos reales. Es el tipo de ensayo más antiguo y sencillo [Tice y Cooper, 1994].

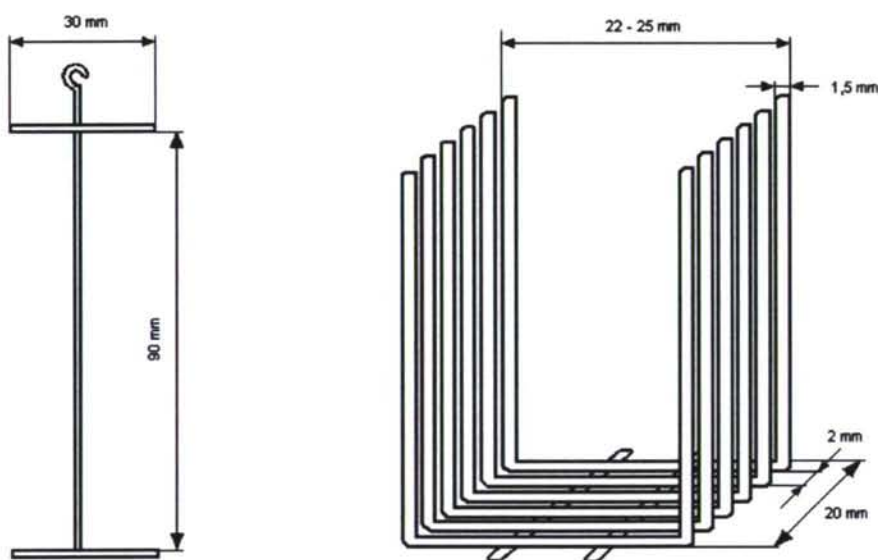


Figura 6. Ejemplos de soportes utilizados para sujetar las láminas de plástico en los ensayos de migración por inmersión total [UNE ENV 13130-1].

*Ensayos con contacto del material por una sola cara con el simulante:*

- Mediante el empleo de una celda normalizada (figura 7): la muestra en forma de lámina se coloca en contacto con el simulante de manera que la geometría de la muestra resulta muy reproducible.
- Por llenado: está indicado para artículos con forma de recipiente, por ejemplo botellas y bandejas.

- Mediante el empleo de una bolsa: la muestra se sella en forma de bolsa por lo que es necesario que sean artículos planos que permitan la suficiente fuerza de sellado para formar bolsas duraderas.

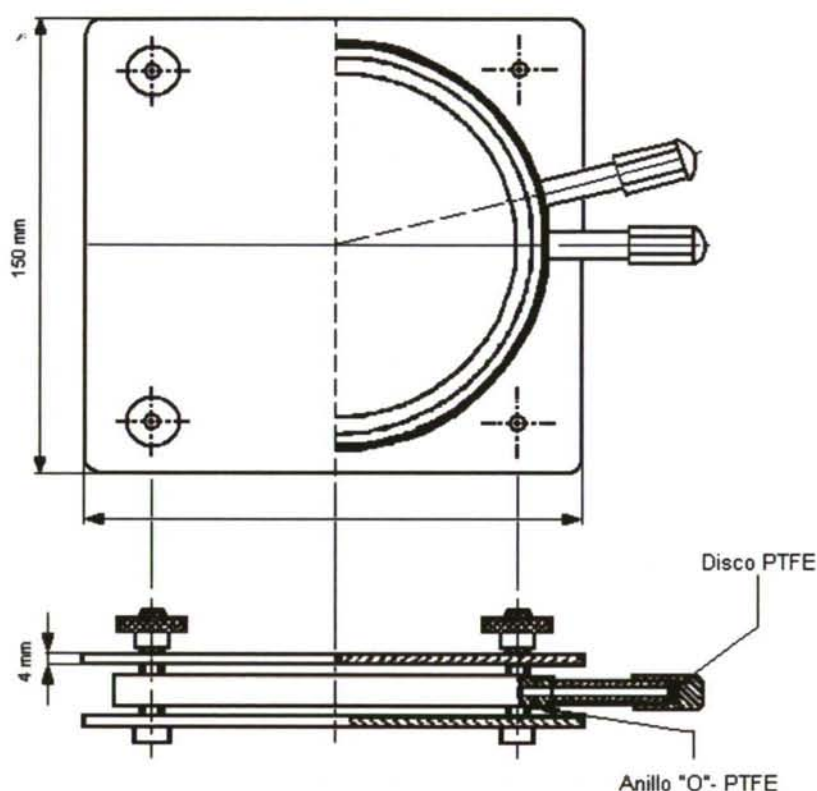


Figura 7. Ejemplo de celda normalizada de acuerdo con la norma UNE-ENV 13130-1.

- Mediante el empleo de una bolsa vuelta de manera que la superficie del material plástico que tendría que estar en contacto con el alimento corresponde a la cara externa de la bolsa, que se expone al simulante mediante inmersión total. Este tipo de ensayo permite calcular el área expuesta con mayor exactitud que la bolsa convencional, y presenta menor riesgo de fugas del simulante.

#### **4.6 Determinación analítica de los niveles de migración global y migración específica**

Aunque las condiciones de contacto entre la materia plástica y el simulante durante el ensayo de migración son muy similares tanto para el ensayo de migración global como específica, el procedimiento analítico que se emplea una vez terminado el contacto plástico/simulante varía según que el objetivo a determinar sea el nivel de migración global o el nivel de migración específica.

##### *Determinación del nivel de migración global*

El objetivo es evaluar la cantidad de materia que cede el material plástico al simulante durante el ensayo de migración, por lo que el procedimiento es diferente en función de si el simulante empleado es o no volátil:

- Simulantes acuosos A, B o C: es el proceso más sencillo ya que consiste en la evaporación del simulante para determinar por pesada el residuo seco.
- Simulante graso: tanto si se utiliza aceite de oliva como sus productos sustitutivos el procedimiento resulta más complejo ya que el simulante no es volátil, por lo que la pérdida de masa ha de medirse en la muestra plástica en lugar de en el simulante. Esta medida no suele ser directa porque la materia plástica tiende a absorber parte del simulante graso con lo que aparentemente su masa aumenta tras el ensayo de migración. Por lo tanto, resulta necesario extraer el simulante absorbido por la muestra para determinarlo cuantitativamente y poder corregir la masa final de la materia plástica. Finalmente, el nivel de migración global se determina por la diferencia entre la masa inicial y la final corregida de la muestra plástica [Directiva 2002/72/CE].



### *Determinación de migración específica*

La determinación analítica del aditivo o monómero en concreto se realiza con un método validado y si no se dispone de él, con un método cuyo límite de detección resulte adecuado teniendo en cuenta el LME o la CM establecidos por la legislación [Directiva 2002/72/CE].

## **4.7 Ensayos de migración según el tipo de alimento**

Los ensayos de migración para un material plástico en concreto deben realizarse con uno o más simulantes de acuerdo con la naturaleza del producto alimenticio con el que vaya a estar en contacto.

La Directiva 82/711/CEE establece una clasificación de varios tipos de alimentos para los que sólo está prescrito el uso de un simulante:

- Alimentos acuosos (aquellos que tengan un  $\text{pH} > 4,5$ ): sólo es necesario realizar el ensayo con el simulante A.
- Alimentos ácidos ( $\text{pH} \leq 4,5$ ): sólo es necesario realizar el ensayo con el simulante B.
- Alimentos alcohólicos: sólo es necesario realizar el ensayo con el simulante C.
- Alimentos grasos: sólo es necesario realizar el ensayo con el simulante D.
- Alimentos secos: para ellos no es necesario realizar ningún ensayo de migración.

Sin embargo, en la práctica las materias plásticas pueden destinarse a estar en contacto con varias mezclas de estos tipos de alimentos, por lo que para seleccionar los simulantes con los que se debe realizar el ensayo de migración, se establece una diferenciación entre [Directiva 82/711/CEE]:

- Materiales y objetos destinados a entrar en contacto con todo tipo de alimentos: este es el caso de los ensayos más estrictos, pues es necesario realizar ensayos empleando los simulante B, C y D.
- Materiales y objetos destinados a entrar en contacto con tipos específicos de alimentos:
  - cuando el material indica con qué tipo de alimentos, acuosos, ácidos, alcohólicos y/o grasos se puede poner en contacto la legislación establece qué simulante/s deben utilizarse para realizar el ensayo [Directiva 82/711/CEE].
  - para los demás casos existe un listado de grupos de productos alimenticios, por ejemplo, cereales, productos lácteos... a los que se asignan los simulantes que se deberán utilizar para realizar los ensayos de migración en cada ensayo [Directiva 85/572/CEE].

Para explicar mejor este último caso podría considerarse un grupo de alimentos en concreto, por ejemplo los productos lácteos que reúnen: leche, leche fermentada, nata, quesos y cuajo dentro de los que a su vez existen otras subclasificaciones, indicando el simulante adecuado para cada uno de ellos (tabla IV).

*Tabla IV. Ejemplo de la selección del simulante a utilizar para cada alimento en concreto.*

07 Productos lácteos 07.04 Quesos:	Simulante A	Simulante B	Simulante C	Simulante D
A. Enteros, con corteza				
B. Fundidos	X (a)	X (a)		
C. Todos los otros	X (a)	X (a)		X/3

Tal como puede verse en la Tabla IV para los quesos se diferencia entre enteros con corteza, fundidos y todos los otros. Para los quesos

enteros con corteza no sería necesario ningún ensayo de migración, mientras que para el queso fundido ofrece la alternativa entre el simulante A o B, según que el pH del alimento sea mayor o menor a 4,5, lo cual se indica mediante la notación (a). Para los restantes quesos habría que realizar además de un ensayo con el simulante A o B un segundo tipo de ensayo con el simulante graso, dividiendo el resultado obtenido por 3, para corregir la mayor capacidad de extracción del aceite de oliva.

## 5 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son aditivos importantes en la formulación de poliolefinas, ya que tienen la función de prevenir su oxidación, que daría lugar a decoloración (amarilleo), pérdida de brillo y transparencia, agrietamiento superficial y deterioro de sus propiedades mecánicas [Cheng-Yu Wang, 2000]. Todas las poliolefinas contienen al menos un antioxidante y generalmente más de uno como mezclas sinérgicas a corto y largo plazo [Munteanu, 1987].

### 5.1 Oxidación de las poliolefinas

La oxidación de la poliolefina puede ser iniciada por la tensión mecánica, el oxígeno, la presencia de residuos de catalizadores o cualquier combinación de ellos y tiene como consecuencia el aumento de los grupos hidroxilo y carbonilo (figura 8).

En la figura 9 se indican las reacciones que tienen lugar en la oxidación térmica de las poliolefinas [Drake y col., 1990].

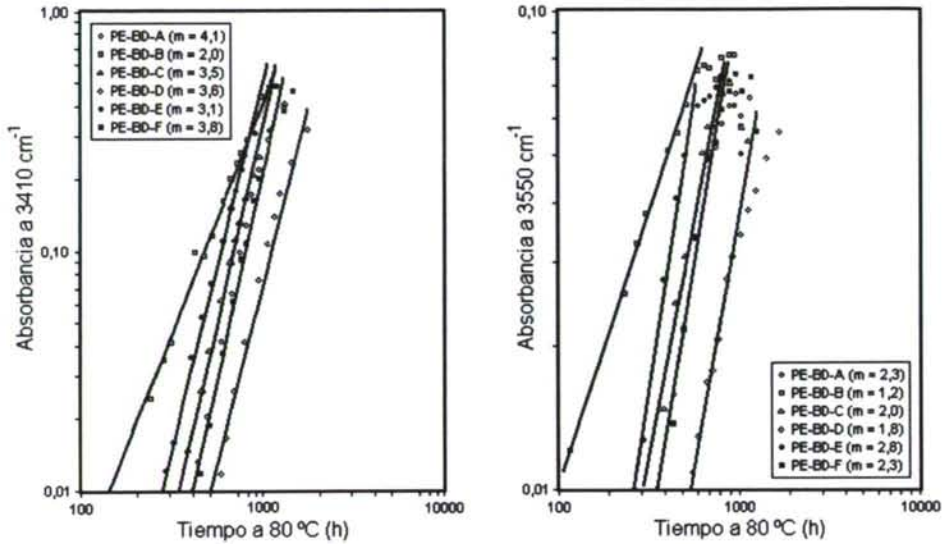


Figura 8. Formación de hidroperóxidos asociados y libres en la oxidación térmica a 80 °C de films de 500  $\mu\text{m}$  (gráficas doble logarítmicas) [Gugumus, 1996].

<p>Inicio:</p> $\text{RH} \longrightarrow \text{R}^\cdot$	<p>Se produce la división homolítica del enlace covalente, que da lugar a dos radicales libres, cada uno con un electrón desapareado.</p>
<p>Propagación:</p> $\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^\cdot$ $\text{ROO}^\cdot + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\cdot$	<p>La reacción en cadena se propaga a través de la formación de un hidroperóxido, acompañada por la formación de otro radical libre.</p>
<p>Ramificación de cadena:</p> $\text{ROOH} \longrightarrow \text{RO}^\cdot + \cdot\text{OH}$ $\cdot\text{OH} + \text{RH} \longrightarrow \text{HO}_2 + \text{R}^\cdot$ $\text{RO}^\cdot + \text{RH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{R}^\cdot$ $\text{RO}^\cdot \longrightarrow \cdot\text{CO} + \text{R}^\cdot$	<p>El radical hidroperóxido se descompone en más radicales libres, capaces de iniciar nuevas reacciones y la desintegración del radical alcoxi.</p>
<p>Terminación:</p> $\text{R}^\cdot + \text{ROO}^\cdot \longrightarrow \text{ROOR}$ $\text{ROO}^\cdot + \text{ROO}^\cdot \longrightarrow \text{ROR} + \text{O}_2 \text{ (ROO}^\cdot \text{ terciario)}$ $\text{ROO}^\cdot + \text{ROO}^\cdot \longrightarrow \cdot\text{CO} + \cdot\text{C-OH} + \text{O}_2$ <p style="text-align: center;">(ROO<math>^\cdot</math> primario o secundario)</p> $\text{R}^\cdot + \text{R}^\cdot \longrightarrow \text{R-R o RH + olefina}$	<p>Las reacciones en cadena terminan cuando dos radicales libres se combinan para formar una especie inactiva.</p>

Figura 9. Reacciones de oxidación térmica de las poliolefinas [Drake y col., 1990].



Si no existe suficiente oxígeno en las condiciones de reacción, no todos los radicales alquilo, ( $R\cdot$ ) pueden ser transformados en radicales alcoxi ( $ROO\cdot$ ) por lo que pueden sufrir otro tipo de reacciones en función del tipo de polímero del que se trate e incluso de los catalizadores empleados. El polipropileno es muy susceptible a la oxidación debido a la presencia del grupo metilo colgante que contiene átomos de hidrógeno terciarios de manera que la extracción de un hidrógeno terciario da lugar a un radical libre ( $PP\cdot$ ) más estable que si fuese primario o secundario. Esto provoca que la reacción de oxidación más frecuente en el polipropileno sea la de rotura de cadena, en la que tiene lugar un decrecimiento en la masa molecular que representa una pérdida gradual de las propiedades mecánicas mientras que el fenómeno del entrecruzamiento, que es más común en la oxidación del polietileno generalmente no tiene lugar [Maier y Calafut, 1998].

Existen diferentes mecanismos para evitar las reacciones de oxidación o reducir su velocidad [Cheng-Yu Wang, 2000]:

- Modificación estructural del polímero mediante copolimerización con monómeros que tienen capacidad antioxidante.
- Introducción de compuestos inertes para desactivar los lugares reactivos del polímero.
- Estabilización física del polímero por orientación del mismo.
- Adición de aditivos estabilizantes, como los antioxidantes, que parece ser la forma más conveniente.

La acción de antioxidantes se basa en la supresión de las especies radicales que se forman debido a los procesos termo-oxidativos y termo-mecánicos [Drake y col., 1990].

## 5.2 Clasificación de los antioxidantes y mecanismos de acción en la poliolefina

La estructura química de los antioxidantes condiciona su mecanismo de acción en las poliolefinas, pudiendo diferenciarse dos categorías: antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios.

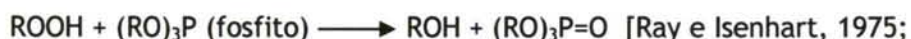
Los *antioxidantes primarios* son conocidos como “antioxidantes rompedores de cadena” debido a que interrumpen el proceso de degradación al interceptar radicales libres ( $R^\cdot$  o  $ROO^\cdot$ ). La mayoría de los antioxidantes primarios son fenoles con impedimento estérico o aminas aromáticas secundarias. Estos compuestos son capaces de reaccionar con los radicales peroxi, especies muy reactivas y transformarlos en un radical fenoxi, menos reactivo, de acuerdo con la siguiente reacción:



A su vez el radical fenoxi formado reacciona con un segundo radical peroxi [Ray e Isenhardt, 1975; Sánchez López, 1992].

El uso de compuestos fenólicos como antioxidantes primarios permite evitar la formación de manchas y la decoloración de la poliolefina, aunque tiene el inconveniente de que estos compuestos cuando se oxidan pueden dar lugar a amarilleo debido a la formación de estructuras quinonas con dobles enlaces conjugados. Este efecto de amarilleo es menor cuando se utilizan compuestos fenólicos de alta masa molecular, con sustituyentes voluminosos que interfieren estéricamente en la reacción de oxidación fenólica impidiendo que se oxiden fácilmente. De todas formas, para evitar el amarilleo suelen emplearse como coaditivos compuestos de fósforo trivalentes y antiácidos (estearato cálcico y estearato de Zn) [Maier y Calafut, 1998].

Los *antioxidantes secundarios* o destructores de peróxido son principalmente compuestos con azufre (éteres y ésteres del ácido tiodipropiónico) o triésteres de ácidos fosforosos (fosfitos). Ambos tipos de antioxidantes actúan reduciendo los hidroperóxidos a especies de alcohol estables (no radicales) en una reacción de oxidación-reducción en la que el fosfito o tioéster se oxida para dar un fosfato o sulfóxido, respectivamente [Maier y Calafut, 1998] de acuerdo con la siguiente reacción:



Sánchez López, 1992; Stevenson y Stein, 2001].

Los fosfitos son los antioxidantes secundarios más utilizados habitualmente ya que no causan decoloración. Estos compuestos resultan muy efectivos como estabilizadores durante el procesado, aunque presentan como desventaja su susceptibilidad a la hidrólisis ya que reaccionan con agua para formar ácidos, por lo que requieren un almacenaje y embalaje especial [Maier y Calafut, 1998].

En la práctica los antioxidantes primarios y secundarios se suelen utilizar de forma combinada para llevar a cabo la estabilización de las poliolefinas ya que con frecuencia muestran efectos sinérgicos [Sánchez López, 1992; Thilén y Shishoo, 2000; Cheng-Yu Wang, 2000; Haider y Karlsson, 2000, 2002] de manera que las combinaciones de fenoles de alta masa molecular con fosfitos o fosfonitos proporcionan suficiente estabilidad para la mayoría de las operaciones de procesado que se realizan hoy en día [Gugumus, 1989]. El uso de fosfitos además de retardar la degradación del polímero ayuda a preservar el nivel de antioxidante primario ya que al actuar reduciendo el hidroperóxido a alcohol evita la formación de  $\text{RO}^\cdot$  y



$\text{OH}^\cdot$ , radicales de propagación potenciales con quienes tendrían que reaccionar los antioxidantes primarios [Stevenson y Stein, 2001].

Un estudio de Ray e Isenhardt de 1975 muestra cómo el uso de sistemas estabilizadores conteniendo antioxidantes fenólicos impedidos combinados con fosfitos o tiofosfitos en poliolefinas, permite obtener un efecto sinérgico de ambos compuestos. Como se puede ver en la figura 10, el índice de fluidez del polímero, que constituye un factor indicativo de su grado de oxidación, es notablemente menor cuando se emplea la mezcla de ambos tipos de antioxidantes. Por otra parte, la combinación de ambos tipos de compuestos tiene la ventaja de que los fosfitos orgánicos inhiben la decoloración que pudiese causar el uso de antioxidantes fenólicos ya que reaccionan con los productos de conversión quinoidales de los fenoles impedidos [Haider y Karlsson, 2002].

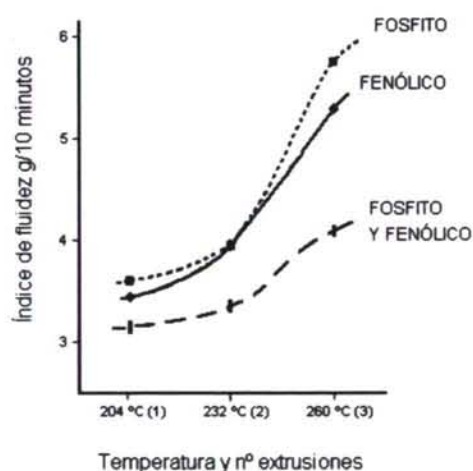


Figura 10. Efecto del uso combinado de antioxidantes fosfito y fenólicos en la estabilización de poliolefinas [Ray e Isenhardt, 1975].

Por último, la combinación de antioxidantes de tipo fosfito y fenólicos garantiza la protección del polímero contra la oxidación durante todo su tiempo de vida puesto que mientras los compuestos fosfito

proporcionan una mayor “protección a corto plazo” durante el procesado o fabricación del producto, los compuestos fenólicos aportan “protección a largo plazo”, durante su uso posterior. Esta diferencia de comportamiento está en consonancia con la estructura de ambos tipos de compuestos: los antioxidantes a “corto plazo”, destinados a proteger el material durante su procesado, deben ser capaces de migrar libremente a través de la masa de polímero para llegar al mayor número de lugares de iniciación generados por las elevadas temperaturas y como consecuencia, son generalmente moléculas pequeñas que a menudo se consumen completamente durante el uso del plástico. Por el contrario, los antioxidantes fenólicos de alta masa molecular están diseñados para proteger el polímero “a largo plazo” por lo que son moléculas de mayor tamaño que presentan baja movilidad a través del polímero [Thilén y Shishoo, 2000].

### *Antioxidantes empleados en algunas poliolefinas*

#### *Polipropileno (PP)*

El PP es bastante estable al calor en ausencia de oxígeno, pero debido a su gran sensibilidad frente a la oxidación por efecto del grupo metilo colgante, es necesaria la adición de antioxidantes inmediatamente después de su polimerización en concentraciones mayores que las que precisan las demás poliolefinas, para evitar su degradación durante el procesado (entre 220 y 280 °C).

Los antioxidantes más utilizados para estabilizar el PP comercial son combinaciones de compuestos de fósforo, antioxidantes secundarios que aportan mayor protección durante el procesado, mezclados con un fenol con impedimento estérico, antioxidante primario, que proteja al polímero frente a la oxidación a largo plazo en concentraciones de 0,05 - 0,5% [Sánchez López, 1992].

Los fenoles pueden ser sustituidos por otros antioxidantes primarios, como son las aminas impedidas estabilizadoras frente a la luz (HALS) y el  $\alpha$ -tocoferol. Las HALS se caracterizan por su función de estabilizadores frente a la luz y han comenzado a utilizarse para dar protección frente a procesos de oxidación.

El  $\alpha$ -tocoferol (ATP o vitamina E), es un antioxidante de origen natural con estructura fenólica. El uso de  $\alpha$ -tocoferol presenta las ventajas que se enumeran a continuación:

- Participa en bajas concentraciones, menores al 0,025%.
- Rapidez de reacción gracias a su estructura molecular menos impedida que facilita una buena estabilidad del procesado y disminuye su olor y sabor.
- Nula toxicidad lo que permite su empleo independientemente del uso final del polímero.

Los principales inconvenientes son que se consume a gran velocidad, se presenta en forma de aceite ámbar viscoso por lo que resulta inapropiado para resinas procesadas con temperaturas en torno a 150°C y es más caro que los otros antioxidantes [Maier y Calafut, 1998].

#### *Polietileno de alta densidad (PEAD)*

El PEAD se procesa a temperaturas de entre 180 y 280 °C y puede sufrir diferentes reacciones de degradación dependiendo del método utilizado para su obtención. Así, el material fabricado de acuerdo con el proceso Ziegler-Natta muestra una mayor tendencia a sufrir la reacción de rotura de cadena, de forma similar al PP, mientras que el PEAD del proceso Phillips tiene mayor tendencia a sufrir reacciones de entrecruzamiento.

El PEAD es menos sensible a la oxidación comparado con el PP por lo que se utilizan concentraciones inferiores (0,03-0,15%) de los mismos



antioxidantes y de igual manera, los fenoles con impedimento estérico de masa molecular media alta también resultan efectivos como antioxidantes de larga duración.

Dentro del PEAD se diferencia el PEAD de alta masa molecular, que se procesa en el intervalo de temperaturas más elevado, entre 220 y 280 °C. Sus características propiedades mecánicas permiten el procesado del polímero ampliando el número de acabados posibles del producto final, como películas de bajo espesor, que aumentan las aplicaciones comerciales del producto. La fase de estabilización del polímero durante el procesado es determinante para la obtención de un producto final óptimo, ya que un ligero entrecruzamiento o ruptura de cadena crean problemas en la fabricación de artículos de buena calidad [Sánchez López, 1992].

#### *Polietileno de baja densidad (PEBD)*

El PEBD se procesa en un intervalo de temperaturas comprendido entre 150-220 °C. En su formulación se incorporan los antioxidantes citados en el PP en concentraciones menores en torno a 0,1% que evitan el entrecruzamiento y la formación de geles por oxidación del PEBD [Sánchez López, 1992].

En la tabla V se resumen algunas características que se han considerado importantes para las poliolefinas más habituales, como las concentraciones de antioxidantes y temperaturas de procesado más habituales para diferentes poliolefinas [Sánchez López, 1992], el grado de cristalinidad [Tice, 2003] y la temperatura de transición vítrea (Tg) [Maier y Calafut, 1998; Tice, 2003].

Tabla V. Concentración de antioxidantes y características físicas de diferentes poliolefinas.

	Concentración antioxidantes (%)	Densidad (g cm <sup>-3</sup> )	T procesado (°C)	Punto fusión (°C)	Grado de cristalinidad (%)	Rango Tg (°C)
PP	0,05-0,25 <sup>c</sup>	0,902-0,905 <sup>a</sup>	220-280 <sup>c</sup>	130-171 <sup>d</sup>	*	De -35° a +26°C <sup>d</sup>
PEAD	0,03-0,15 <sup>c</sup>	0,940-0,970 <sup>b</sup>	180-280 <sup>c</sup>	120-130 <sup>b</sup>	70-90 <sup>b</sup>	De -180 °C a -120°C <sup>b</sup>
PEBD	= 0,1 <sup>c</sup>	0,915-0,940 <sup>b</sup>	150-220 <sup>c</sup>	105-115 <sup>b</sup>	45-55 <sup>b</sup>	

\*Varía según la estructura estereoquímica, procesado, condiciones de cristalización y presencia de aditivos [Maier y Calafut, 1998].

<sup>a</sup>[Repsol-productos químicos]

<sup>b</sup>[Tice, 2003]

<sup>c</sup>[Sánchez López, 1992]

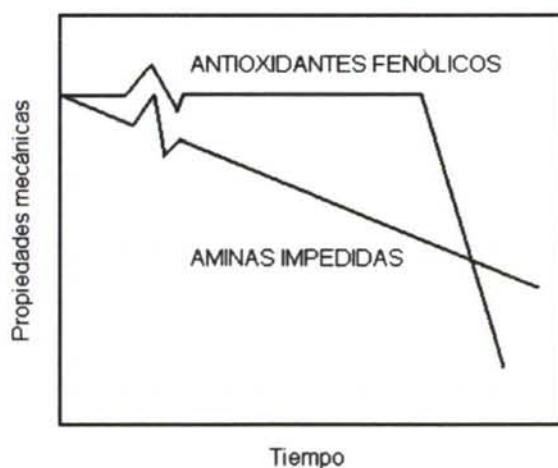
<sup>d</sup>[Maier y Calafut, 1998]

### 5.3 Evolución en el uso de antioxidantes

En los primeros años de fabricación de PP se utilizaron combinaciones de antioxidantes fenólicos de alta y baja masa molecular para proporcionar o mejorar la estabilidad durante el procesado. Estas combinaciones fueron reemplazadas progresivamente por mezclas de antioxidantes fenólicos de alta masa molecular con fosfitos o fosfonitos como sistemas estabilizadores para el procesado tanto de PP como de PEAD o PEBD ya que proporcionaban una estabilidad mayor que las combinaciones entre el los antioxidantes fenólicos de alta y baja masa molecular, consiguiéndose al mismo tiempo, reducir la alteración del color del polímero gracias a la presencia del antioxidante fosfito [Gugumus, 1989].

En los últimos años, ha progresado el uso como antioxidantes de las *Hindered Amine Light Stabilizers* (HALS), aminas impedidas estabilizantes a la luz, que hasta entonces se había utilizado por su gran efectividad en la absorción de la radiación lumínica [Capella, 2001], gracias al desarrollo de HALS de alta masa molecular. Con el uso de las HALS disponibles originariamente, compuestos de baja masa molecular, no se observaban

efectos de protección frente a la oxidación térmica lo que podría atribuirse a la volatilidad de estos compuestos a las temperaturas de ensayo mientras que las de alta masa molecular poliméricas o no poliméricas, introducidas posteriormente, no se volatilizan tan fácilmente permaneciendo disponibles para actuar como captadores de radicales y/o descomponedores de hidroperóxidos [Gugumus, 1989]. Aunque se ha recomendado su uso como antioxidantes “a largo plazo”, la comparación entre los antioxidantes fenólicos y las HALS muestra que estas últimas son más efectivas a bajas temperaturas ( $<120^{\circ}\text{C}$ ) que a altas ( $150^{\circ}\text{C}$ ) y que la degradación del polímero estabilizado con unos u otros compuestos es muy diferente: mientras que el polímero protegido con HALS se va oxidando gradualmente, aquel en el que se utilizan antioxidantes fenólicos sufre una rápida degradación final tras un largo período de tiempo sin experimentar ningún cambio (figura 11).



*Figura 11. Representación esquemática de la evolución en las propiedades mecánicas de PP estabilizado mediante antioxidantes fenólicos o aminas impedidas [Gijsman, 2001].*

De acuerdo con Gijsman (2001) esto podría deberse a que las HALS no resultan efectivas como antioxidantes primarios sino como secundarios.



El mecanismo que explicaría la acción antioxidante de las HALS está en estudio [Gijssman, 2001] así como el uso combinado de las HALS y los antioxidantes fenólicos que puede resultar sinérgico o antagónico dependiendo de las condiciones [Yamashita y Ohkatsu, 2003].

#### **5.4 Límites de migración establecidos por la legislación en los antioxidantes estudiados**

Los antioxidantes objeto del presente estudio, que han sido seleccionados por su amplia utilización en la estabilización de poliolefinas son varios compuestos fenólicos de diferente masa molecular y un antioxidante fosfito, se recogen en la tabla VI, junto con su correspondiente número de registro del CAS (Chemical Abstracts Service) para facilitar su identificación; masa molecular (M); número de referencia empleado por la legislación europea y sección de las listas positivas en las que aparece, A o B; restricciones establecidas por la legislación europea (LME) y el suministrador comercial del que se obtuvo el compuesto.

Como se puede observar, todos los compuestos estudiados aparecen en las listas de aditivos que se pueden añadir a los materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos a excepción del DBP, compuesto que no se suele añadir directamente a las poliolefinas sino que generalmente se forma como producto de la degradación de otros antioxidantes.

La introducción de los antioxidantes en dichas listas fue progresiva, de manera que en la actualidad los compuestos Ethanox 330, Irgafos 168 e Irganox 1010 aparecen en la sección A sin ninguna restricción, mientras que AO 2246, AO 425, BHA, BHT e Irganox 1076 forman parte de la sección B con su correspondiente LME, cuya verificación en el simulante D deberá cumplirse a partir del 1 de julio de 2006.



Tabla VI. Límites de migración establecidos para los antioxidantes estudiados.

	Nombre químico	Nº. CAS	M	Nº ref. (sección)	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	Fuente
AO 2246	2, 2'-metilenbis (4-metil-6-terc-butilfenol)	119-47-1	340	66480 (B)	1,5 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
AO 425	2, 2'-metilenbis (4-etil-6-terc-butilfenol)	88-24-4	369	66400 (B)		
BHA	Terc-butil-4-hidroxianisol	25013-16-5	180	40720 (B)	30 <sup>b</sup>	
BHT	2, 6 di-terc-butil-p-cresol	128-37-0	220	46640 (B)	3 <sup>b</sup>	
DBP	2, 4-di-terc-butil-fenol	96-76-4	206			Fluka Buchs Suiza)
Ethanox 330	1, 3, 5-trimetil-2, 4, 6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno	1709-70-2	775	95200 (A)	Sin LME <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich
Irgafos 168	Fosfito de tris(2, 4-diterc-butilfenilo)	31570-04-4	647	74240 (A)	Sin LME <sup>a</sup>	Ciba (Basel, Suiza)
Irganox 1010	Tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol	6683-19-8	1178	71680 (A)	Sin LME <sup>a</sup>	
Irganox 1076	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo	2082-79-3	531	68320 (B)	6,0 <sup>a</sup>	

\*Límite de migración específica total establecido para la suma de ambos compuestos

<sup>a</sup>Rectificación DO L39 de 13/2/2003, p. 1 de la Directiva 2002/72/CE

<sup>b</sup>Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004

Como se comentó anteriormente, las listas de aditivos son incompletas y se han ido modificando a lo largo del tiempo como se refleja en la incorporación que han sufrido los compuestos estudiados:

- AO 2246, AO 425, Irganox 1010, E330 e Irgafos 168 actualmente se incluyen en la Directiva 2002/72/CE habiéndose incorporado a las

listas de forma progresiva mediante modificaciones a la normativa 90/128/CEE:

- E330, Irganox 1010 e Irgafos 168 por la Directiva 95/3/CE de la Comisión de 14 de febrero de 1995 sin establecer ninguna restricción en su migración.
- Irganox 1076, AO 2246 y AO 425 por la Directiva 2001/62/CE de la Comisión de 9 de agosto de 2001 con sus correspondientes LME.
- El BHA y el BHT se introducen con la Directiva 2004/19/CE que modifica a la Directiva 2002/72/CE, con sus correspondientes LME.

Aunque la legislación europea sólo establece LME para estos antioxidantes en los alimentos o simulantes de alimentos, otras legislaciones como la estadounidense y la británica regulan el nivel de concentración máximo de estos compuestos en las poliolefinas, por lo que se han incluido los valores correspondientes en la tabla VII.

Todos estos compuestos aparecen también en la lista de la FDA de aditivos indirectos para embalajes en contacto con alimentos, excepto el DBP, al tratarse de un producto de degradación del Irgafos 168, concretamente un producto de hidrólisis, no está incluido en ninguna de las listas mencionadas.

## **5.5 Toxicología de los antioxidantes estudiados**

El BHA y el BHT se han utilizado desde hace años como antioxidantes de alimentos, de forma que el BHA se ha añadido a grasas comestibles y alimentos que contienen grasas desde 1947 [Report on Carcinogens, 2002]. Aunque esto podría hacer pensar que ambos

compuestos no resultan especialmente tóxicos, la toxicidad tanto del BHA como del BHT ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años.

*Tabla VII. Concentración máxima permitida en las poliolefinas destinadas a entrar en contacto con alimentos.*

	Concentración máxima permitida	Legislación
AO 2246	0,1%	FDA 2004 [Title 21, 178.2010]
AO 425	0,5%	British Standard 1992 [Sheftel, 2000] (FDA no regula su uso para poliolefinas)
BHA	0,02 % del contenido total de grasa o aceite del alimento*	FDA 2004 [Title 21, 182.3169]
	0,2%	British Standard 1992 [Sheftel, 2000]
BHT	0,02 % del contenido total de grasa o aceite del alimento*	FDA 2004 [Title 21, 182.3173]
Ethanox 330	0,5%	FDA 2004 [Title 21, 178.2010]
Irgafos 168	0,2 o 0,25% (depende del tipo de poliolefina)	FDA 2004 [Title 21, 178.2010]
Irganox 1010	0,5%	British Standard 1992 [Sheftel, 2000]
	0,5%	FDA 2004 [Title 21, 178.2010]
Irganox 1076	0,5%	British Standard 1992 [Sheftel, 2000]
	0,25%	FDA 2004 [Title 21, 178.2010]

\* BHA y BHT están regulados como ingrediente de alimentos directo o indirecto y considerados como GRAS cuando el contenido total de antioxidantes no sea mayor del valor indicado

Derache y col. (1990) recopilaron las numerosas investigaciones desarrolladas hasta ese momento sobre los efectos toxicológicos que pueden causar el BHA y el BHT en diferentes especies biológicas. La interpretación de los estudios recogidos resulta difícil, porque mientras que en ciertas especies se han detectado efectos preocupantes a nivel de ciertos órganos diana, que varían según la especie considerada, en otras especies estos efectos no se manifiestan. Por otra parte, resulta difícil



extrapolar al hombre los datos obtenidos mediante experimentación animal, ya que existen tejidos diana que se encuentran en los animales de experimentación pero no en el hombre y no se dispone de suficientes datos sobre el metabolismo de los antioxidantes fenólicos en el hombre y en las especies más utilizadas en experimentación animal.

En la actualidad continúa siendo necesario revisar el comportamiento toxicológico de ambos compuestos ya que en el caso del BHT los estudios toxicológicos muestran diferentes efectos dependiendo del trabajo y del animal de ensayo, de forma que en algunos casos inhibe el crecimiento del cáncer mientras que en otros lo incrementa [Tombesi y Freije, 2002] y en el caso del BHA existen estudios que muestran que su valor de ADI (Ingesta Diaria Aceptable, estimación de la cantidad de una sustancia en alimentos que puede ser ingerida diariamente durante la vida del hombre sin riesgo apreciable) de  $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$  de masa del cuerpo podría no ser suficiente para proteger al hombre de sus efectos adversos [Sheftel, 2000].

Los antioxidantes fenólicos AO 2246, AO 425, Irgafos 168, Irganox 1010 e Irganox 1076 han sido menos investigados a nivel toxicológico y la mayoría de los datos disponibles se refieren también a trabajos con animales de laboratorio.

De los restantes antioxidantes estudiados, DBP, producto de degradación e Irgafos 168, antioxidante fosfito, apenas se encontró información sobre sus efectos toxicológicos.

En la tabla VIII se presenta un resumen de los valores de  $LD_{50}$  (dosis de ingestión a la que esa sustancia causa la muerte para un 50% de la población de ensayo) y algunos de los efectos toxicológicos causados por estos antioxidantes.



Tabla VIII. Valores de LD<sub>50</sub> y toxicidad de los antioxidantes estudiados.

	LD <sub>50</sub>	Efectos que causa según los estudios de toxicidad
AO 2246	5,0 g Kg <sup>-1</sup> en ratas y 11 g Kg <sup>-1</sup> en ratones	En ratas: sobre la actividad refleja, mucosa intestinal y gástrica, hígado, miocardio, tubos renales, bronquios y pulmones y efectos en su reproducción [Sheftel, 2000].
AO 425	10 g Kg <sup>-1</sup> en ratas	En ratas: sobre el hígado, riñón, testículos, paratiroides, y efectos en su reproducción [Sheftel, 2000].
BHA	2,2 g Kg <sup>-1</sup> en ratas y 2,0 g Kg <sup>-1</sup> en ratones	En ratas: efectos en el "forestomach" y estómago. Evidencias de carcinogénesis en estudios de toxicidad reproductiva en animales [Sheftel, 2000]. Actividad carcinogénica en el hombre: considerado como una sustancia que puede preverse de forma razonable que sea carcinogénica aunque no existan datos disponibles para evaluar su efecto carcinógeno en el hombre [Report on Carcinogens, 2002].
BHT	2 g Kg <sup>-1</sup> , 5 g Kg <sup>-1</sup> hasta 10 g Kg <sup>-1</sup> en ratas, varían según diferentes autores	En ratas: sobre el hígado y los pulmones, atrofia testicular y decrecimiento de la espermatogénesis. Actividad carcinogénica en el hombre: la Agencia Internacional de investigación sobre el cáncer concluye que hay una evidencia limitada de su actividad carcinogénica en animales de laboratorio pero que no existen datos válidos para evaluar su actividad en el hombre [Sheftel, 2000].
DBP	150 µM en ratas	En ratas: efectos en el hígado [Moridani y col., 2003].
Ethanox 330	1,5 g Kg <sup>-1</sup> en ratas	En ratas: efectos en hígado, riñón y estómago [Sheftel, 2000].
Irgafos 168	> 2 g Kg <sup>-1</sup> en ratas	[Ciba Specialty Chemicals].
Irganox 1010	No se dispone de este dato	En ratones: disminución de la ganancia en peso [Sheftel, 2000].
Irganox 1076	> 15 g Kg <sup>-1</sup> en ratas	En ratas: retraso en la ganancia en peso [Sheftel, 2000].

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alnafouri, A.J. y Franz, R. (1999). A study on the equivalence of olive oil and the EU official substitute test media for migration testing at high temperatures. *Food Additive and Contaminants*, 16 (10) 419-431.

Ashby, R. (1997a) "Future developments in directives for plastics and polymeric coatings intended to come into contact with food" en Ashby, R.; Cooper, I.; Harvey, S. y Tice, P. "Food packaging migration and legislation". Ed. *Pira International*, Surrey, UK. Cap. 2, 165-174.

Ashby, R. (1997b) "Standard methods of test for plastics and polymeric coatings intended to come into contact with food" en Ashby, R.; Cooper, I.; Harvey, S. y Tice, P. "Food packaging migration and legislation". Ed. *Pira International*, Surrey, UK. Cap. 6, p. 17-37.

Baner, A.; Bieber, W.; Figge, K.; Franz, R. y Piringer, O. (1992) Alternative fatty food simulants for migration testing of polymeric food contact materials. *Food Additives and Contaminants*, 9 (2), 137-142.

Baner, A.L.; Franz, R. y Piringer, O. (1994a) Alternative methods for the determination and evaluation of migration potential from polymeric food contact materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 90 (6), 181-185.

Baner, L.; Franz, R. y Piringer, O. (1994b) Alternative methods for the determination and evaluation of migration potential from polymeric food contact materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 90 (5), 137-142.

Baner, A.; Brandsch, J.; Franz, R. y Piringer, O. (1996) The applications of a predictive migration model for evaluating the compliance of plastic materials with European food regulations. *Food Additives and Contaminants*, 13 (5), 587-601.

Bejarano, E. (2001) Plásticos en contacto con alimentos. *Boletín informativo AIMPLAS*, nº 5, 6-7.

Brandsch, J.; Mercea, P.; Rüter, M.; Tosa, V. y Piringer, O. (2002) Migration modelling as a tool for quality assurance of food packaging. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 29-41.

Capella, F. (2001) Aditivos: base del progreso de los materiales plásticos. *Plásticos Universales*, nº 69, 53-54.

Catalá, R. y Gavara, R. (2002) “Fundamentos y mecanismos de los fenómenos de migración” en Catalá, R. y Gavara, R. “Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos”. *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. I, p. 1-17.

Centro Español de Plásticos Estudio estadístico (2004) “El sector de los plásticos: estadísticas, situación y perspectivas” <http://www.cep-inform.es/esp/publicaciones/estudiosector.asp>.

Chang, S.S y col. (1982) Migration of low molecular weight additives in polyolefins and copolymers. Final report. *Program National Bureau of Standards* patrocinado por FDA. Washington D.C.

Cheng-Yu Wang, F. (2000) Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography. IV antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 891, 325-336.

Chung, D.; Papadakis, S.E. y Yam, K.L. (2002) Simple models for assessing migration from food-packaging films. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 611-617.

Ciba Specialty Chemicals <http://www.cibasc.com/>



Cooper, I.; Goodson, A. y O'Brien, A. (1998) Specific migration testing with alternative fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15 (1), 72-78.

Crank, J. (1975) The mathematics of diffusion, *Oxford University Press*, UK.

De Kruijf, N. y Rijk, M.A.H. (1988) Iso-octane as fatty food simulant: possibilities and limitations. *Food Additives and Contaminants*, 5 (suplemento nº1), 467-483.

Derache R. (1990) Toxicología y seguridad de los alimentos *Ed. Omega*, Barcelona.

Directiva 82/711/CEE del Consejo de 18 de octubre de 1982 que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 297, 23/10/1982, p. 26.

Directiva 85/572/CEE del Consejo de 19 de diciembre de 1985, por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios, DO L372, 31/12/1985, p. 14.

Directiva 90/128/CEE de 23 de febrero de 1990 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 75, 21/3/1990, p. 19. Rectificación DO L 349, 13/12/1990, p. 26.

Directiva 92/39/CEE de la Comisión de 14 de mayo de 1992, DO L168, 23/6/1992, p. 21. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 93/8//CEE de la Comisión de 15 de marzo de 1993, DO L90, 14/4/1993 p. 22. Enmienda a la Directiva 82/711/CEE.

Directiva 93/9/CEE de la Comisión de 15 de marzo de 1993, DO L90, 14/4/1993, p. 26. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 95/3/CEE de la Comisión de 14 de febrero de 1995, DO L41, 23/2/1995, p. 44. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 96/11/CE de la Comisión de 5 de marzo de 1996, DO L61, 12/3/1996, p. 26. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 97/48/CE de la Comisión de 29 de julio de 1997, DO L222, 12/8/1997 p. 10. Enmienda a la Directiva 82/711/CEE.

Directiva 1999/91/CE de la Comisión de 23 de noviembre de 1999, DO L310, 4/12/1999, p. 41. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 2001/62/CE de la Comisión de 9 de agosto de 2001, DO L221, 17/8/2001, p.18. Enmienda a la Directiva 90/128/CEE.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 220, 15/8/2002, p. 18. Rectificación DO L39, 13/2/2003, p.1.

Directiva 2004/1/CE de la Comisión de 6 de enero de 2004, DO L7, 13/1/2004, p. 45. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004, DO L71, 10/3/2004, p. 8. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

Directiva del Consejo 89/109/CEE de 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los

materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 40, 11/2/1989, p. 38. Rectificación DO L 347, 28/11/1989, p. 37.

Drake, W.O.; Pauquet, J.R.; Tudesco, R.V. y Zweifel, H. (1990) Processing stabilization of polyolefin. *Angewandte Makromolekulare CEIME*. 176/177 (3069), 215-231.

FDA (*Food and drug administration*)

Lista de aditivos “indirectos” (2004):

<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-indt.html>

Guidance for Industry. Preparation of Food Contact Notifications and Food Additive Petitions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations. Final Guidance (2002) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa2pmnc.html#iid1a>

Title 21. Food and drugs (2004) Code of Federal Regulations (CFR). US Government Printing Office (GPO). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>

Secciones 178.2010. Antioxidants and/or stabilizers for polymers; 182.3169. Butylated hydroxyanisole; 182.3173. Butylated hydroxitoluene.

Feigenbaum, A.; Scholler, D.; Bouquant, J.; Brigot, G.; Ferrier, D.; Franz, R.; Lillemark, L.; Riquet, A.M.; Petersen, J. H.; Van Lierop, B. y Yagoubi, N. (2002) Safety and quality of food contact materials. Part 1: Evaluation of analytical strategies to introduce migration testing into good manufacturing practice. *Food Additives and Contaminants*, 19 (2), 184-201.



Garde, J.A.; Catalá, R.; Gavara, R. y Hernández, R.J. (2001) Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 18 (8), 750-762.

Garrigós, M.C. y Reche, F. (2001) Situación actual de los plastificantes de tipo ftalato. *Plásticos universales*, 69 (Junio-Julio), 56-58.

Gijsman, P. (2001) "Mechanism of the thermooxidative degradation of unstabilized and stabilized polypropylene-containing phenolic antioxidant and hindered amine stabilizers" en Al-Malaika, S.; Golovoy, A. y Wilkie, C.A. "Specialty polymer additives. Principles and applications". Ed. *Blackwell science*, London, UK. Cap. 5, p. 67-90.

Gómez Antón, M.R. y Gil Tercero, J.R. (1997) Los plásticos y el tratamiento de sus residuos. *Universidad Nacional de Educación a Distancia*, Madrid, España. Cap. 7. Aditivación y técnicas de transformación, p. 127-144.

Gugumus, F. (1989) Advances in Stabilization of Polyolefins. *Polymer Degradation and Stability*, 24, 289-301.

Gugumus, F. (1996) Thermooxidative degradation of polyolefins in the solid state: Part 1. Experimental kinetics of functional group formation. *Polymer Degradation and Stability*, 52, 131-144.

Haider, N. y Karlsson, S. (2000) Kinetics of migration of antioxidants from polyolefins in natural environments as a basis for bioconversion studies. *Biomacromolecules*, 1, 481-487.

Haider, N. y Karlsson, S. (2002) Loss and transformation products of the aromatic antioxidants in MDPE film under long-term exposure to biotic and abiotic conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 85, 974-988.

Hashizume, K.; Toda, C.; Yasui, T. y Nagano, H. (1988) Determination of Butylated Hidroxylanisole and Butylated Hydroxytoluene in oily foods and dried fish by High-Performance Liquid Chromatography. *Eisei Kagaku*, 34 (6), 550-554.

Hellerich, Harsch y Haenle (1989). Guía de materiales plásticos. Ed. *Hanser*, 1ª edición española, Barcelona, España. Cap. I. Estructura y comportamiento de plásticos, p. 1-38.

Helmroth, I.E.; Dekker, M. y Hankemeier, T. (2002) Influence of solvent absorption on the migration of Irganox 1076 from LDPE. *Food Additives and Contaminants*, 19 (2), 176-183.

Jickells, S.M.; Gancedo, P.; Nerin, C.; Castle, L. y Gilbert, L. (1993) Migration of styrene monomer from thermoset polyester cookware into foods during high temperature applications. *Food Additives and Contaminants*, 10 (5), 567-573.

Kuznesof, P.M. (2002) "Legislación sobre envases de alimentos en los Estados Unidos" en Catalá, R. y Gavara, R. "Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos". *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. IV, p. 65-81.

Limm, W. y Hollifield, H.C. (1996) Modelling of additive diffusion in polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 13 (8), 949-967.

Maier, C. y Calafut, T. (1998) Polypropylene. The definitive user's guide and databook. Ed: *Plastics Design Library*. Cap 1. Chemistry, p. 3-10; Cap. 2. Morphology and commercial forms p. 11-26; Cap. 3. Additives, p. 27-47.

Mateo, J.L. (2001) Materiales poliméricos para envases y embalajes. *Revista de plásticos modernos*, 81 (536), 213-220.

Métois, P.; Scholler, D.; Bouquant, J. y Feigenbaum, A. (1998) Alternative test methods to control the compliance of polyolefin food packaging materials with the European Union regulation: the case of aromatic antioxidants and of bis(ethanolamine) antistatics based on  $^1\text{H}$ -NMR and UV-visible spectrophotometry. *Food Additives and Contaminants*, 15 (1), 100-111.

Moridani, M.Y.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. (2003) Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rats hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 145, 213-223.

Munteanu, D.; Isfan, A.; Isfan, C. y Tincul, I. (1987) High-performance liquid chromatographic separation of polyolefin antioxidants and light-stabilisers. *Chromatographia*, 23 (1), 7-14.

Note for guidance for food contact materials (2003): Note for guidance of petitioner when presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation. European Commission. Health & consumer protection directorate-general. [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/note\\_guidance\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/note_guidance_en.pdf) SANCO D3/LR D (2003).

O'Brien, A.P.; Cooper, I. y Tice P.A. (1997) Correlation of specific migration (Cf) of plastic additives with their initial concentration in the polymer (Cp). *Food Additives and Contaminants*, 14 (6-7), 705-719.

O'Brien, A.; Goodson, A. y Cooper, I. (1999) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for high density polyethylene (HDPE). *Food Additives and Contaminants*, 16 (9), 367-380.



O'Brien, A. y Cooper, I. (2001) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for polypropylene. *Food Additives and Contaminants*, 18 (4), 343-355.

O'Brien, A. y Cooper, I. (2002) Practical experience in the use of mathematical models to predict migration of additives from food-contact polymers. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 63-72.

Oi-Wah Lau y Siu-Kay Wong (2000) Contamination in food from packaging material. Review. *Journal of Chromatography A*, 882, 255-270.

Petersen, J.H. (2003) "Migration of compounds from food contact materials and articles" en D'Mello, J.P.F. "Food Safety: contaminants and toxins". Ed. Oxon: CABI. Wallingford, UK. Cap. 12, p. 271-291.

Ray, W.C. e Isenhardt, K. (1975) Phosphites in polyolefin process stabilization. *Polymer Engineering and Science*, 15 (10) 703-707.

Real Decreto 118/2003 de 31 de enero. Materias plásticas. Aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE nº 36, 11/2/2003, p. 5310. Rectificación BOE nº 22, 20/5/2004, p.19049. Corrección de erratas BOE nº 279, 19/11/2004, p. 38192.

Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DOCE L 338, 13/11/2004, p. 4 - 14.



Report on Carcinogens (2002), Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 5º edición, U.S.A  
<http://ehp.niehs.nih.gov/roc/toc10.html>.

Repsol-productos químicos:

<http://www.repsolypf.com/esp/productosyservicios/productosyservicios/productosquimicos/quimicaindice.asp?Nivel=0#>

Reynier, A.; Dole, P. y Feigenbaum, A. (2001) Additives diffusion coefficients in polyolefins. II. Effect of swelling and temperature on the D=f(M) correlation. *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 2434-2443.

Reynier, A.; Dole, P. y Feigenbaum, A. (2002a) Integrated approach of migration prediction using numerical modelling associated to experimental determination of key parameters. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 42-55.

Reynier, A.; Dole, P. y Feigenbaum, A. (2002b) Migration of additives from polymers into food simulants: numerical solutions of a mathematical model taking into account and polymer interactions. *Food Additives and Contaminants*, 19 (1), 89-102.

Rodríguez Pin, E.; Rodríguez Pin, M. y Riera Rodríguez, F. (2003) Envases y embalajes plásticos alimentarios. *Alimentación equipos y tecnología*, 22 (176), 52-60.

Roduit, B.; Borgeat, C.; Cavin S.; Fragnière, C y Dudler, V. (2004) Application of finite element method (FEM) for the simulation of release of additives from multilayer packaging. *3<sup>rd</sup> International Symposium on Food Packaging-Ensuring the Safety, Quality and Traceability of Foods*. 17-19 november 2004, Barcelona, España.

Sánchez López, S. (1992) Aditivos para material plástico. Antioxidantes y estabilizadores UV. Ed. Limusa, grupo Noriega editores, México. Cap. 1. Antioxidantes, p. 9-26.

Scholler, D.; Vergnaud, J.M.; Bouquant, J. Vergallen, H. y Feigenbaum, A. (2003) Safety and quality of plastic food contact materials. Optimization of extraction time and extraction yield, based on arithmetic rules derived from mathematical description of diffusion. Application to control strategies. *Packaging Technology and Science*, 16, 209-220.

Schwoppe, A.D.; Till, D.E.; Ehntholt, D. J.; Sidman, K.R y Whelan R.H. (1987a) Migration of BHT and Irganox 1010 from low-density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids. *Food and Chemical Toxicology*, 25 (4), 317-326.

Schwoppe, A.D.; Till, D.J.; Sidman, K.R. y Whelan, R.H. (1987b) Migration of Irganox 1010 from ethylene-vinyl acetate films to foods and food-simulating liquids. *Food and Chemical Toxicology*, 25 (4), 327-330.

Sheftel, V.O. (2000) Indirect food additives and polymers. Migration and toxicology. Ed. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA.

Shorten (1997) "EU regulations on food contact materials and articles" en Ashby, R.; Cooper, I.; Harvey, S. y Tice, P. "Food packaging migration and legislation". Ed. Pira International, Surrey, UK. Cap. 1, p. 1-16.

Stevenson, D.R. y Stein, D.L (2001) "Organic phosphites as polymer stabilizers" en S. Al-Malaika,S.; Golovoy, A. y Wilkie, C.A. "Specialty Polymer Additives en Principles and applications". Ed. Blackwell science, London, UK. Cap. 4, p. 43-66.

Thilén, M. y Shishoo, R. (2000) Optimization of experimental parameters for the quantification of polymer additives using SFE/HPLC. *Journal of Applied Polymer Science*, 76, 938-946.

Tice, P.A. y Cooper, I. (1994) "Ensayos de migración para envases de alimentos" en Watson, D.H. y Meah, M.N. "Migración de sustancias químicas desde el envase al alimento" Vol II. Ed. Acribia, Zaragoza, España, p. 1-28.

Tice, P. (2003) Packaging materials. Cap. 4. Polyethylene for food packaging applications. *ILSI Europe Reports Series*  
[http://europe.ilsil.org/file/PM4\\_Polyethylene.pdf](http://europe.ilsil.org/file/PM4_Polyethylene.pdf).

Till, D.E.; Ehntholt, D.J.; Reid, R.C.; Schwartz, P.S.; Sidman, K.R.; Schwope, A.D. y Whelan, R.H. (1982) Migration of BHT antioxidant from high density polyethylene to foods and food simulants. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 21, 106-113.

Tombesi, N.B. y Freije, H.N. (2002) Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water. *Journal of Chromatography A*, 963, 179-183.

UNE-EN 1186 Versión en español de la Norma Europea EN 1186 de abril de 2002. Materiales y artículos en contacto con productos alimenticios. Plásticos.

UNE-EN 1186-1:2002. Guía para la elección de condiciones y métodos de ensayo para la migración global.

UNE-EN 1186-2:2002. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva por inmersión total.

UNE-EN 1186-3:2002. Métodos de ensayo para la migración global en simuladores de alimentos acuosos por inmersión total.



UNE-EN 1186-4:2002. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva con una célula.

UNE-EN 1186-5:2002. Métodos de ensayo para la migración global en simuladores de alimentos acuosos con una célula.

UNE-EN 1186-6:2002. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva utilizando una bolsa.

UNE-EN 1186-7:2002. Métodos de ensayo para la migración global en simuladores de alimentos acuosos utilizando una bolsa.

UNE-EN 1186-8:2002. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva por llenado.

UNE-EN 1186-9:2002. Métodos de ensayo para la migración global en simuladores de alimentos acuosos por llenado.

UNE-EN 1186-10:2003. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva (método modificado para su utilización en el caso de que se produzca una extracción incompleta del aceite de oliva).

UNE-EN 1186-11:2003. Métodos de ensayo para la migración global hacia mezclas de C14-triglicéridos sintéticos.

UNE-EN 1186-12:2002. Métodos de ensayo para la migración global a bajas temperaturas.

UNE-EN 1186-13:2003. Métodos de ensayo para la migración global a elevada temperatura.

UNE-EN 1186-14:2003. Métodos de ensayo para los “ensayos sustitutivos” de la migración global desde los plásticos destinados al contacto con alimentos grasos empleando un medio de ensayo de iso-octano y etanol al 95%.

UNE-EN 1186-15:2003. Métodos de ensayo alternativos para la migración en simuladores de alimentos grasos mediante extracción rápida con iso-octano y/o etanol al 95%.

UNE-ENV 13130. Versión en español de la Norma Europea Experimental ENV 13130 de marzo de 1999. Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias plásticas sujetas a limitaciones.

UNE-ENV 13130-1:2000. Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes de alimentos.

UNE-ENV 13130-2:2000. Determinación de ácido tereftálico en simulantes de alimentos.

UNE-ENV 13130-3:2000. Determinación de acrilonitrilo en alimentos y simulantes de alimentos.

UNE-ENV 13130-4:2000. Determinación de 2,3 butadieno en materiales plásticos.

UNE-ENV 13130-5:2000. Determinación de cloruro de vinilideno en simulantes de alimentos.

UNE-ENV 13130-6:2000. Determinación de cloruro de vinilideno en materiales plásticos.

UNE-ENV 13130-7:2001. Determinación del etilen glicol y del dietilen glicol en simulantes de alimentos.

UNE-ENV 13130-8:2001. Determinación de isocianatos en materiales plásticos.

prCEN/TS 13130-9. Determination of 1,3-butadiene in food simulants.

prCEN/TS 13130-10. Determination of acrylamide in food simulants.

prCEN/TS 13130-11. Determination of 11-aminoundecanoic acid in food simulants.

prCEN/TS 13130-12. Determination of 1,3-benzenedimethanamine in food simulants.

prCEN/TS 13130-13. Determination of 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in food simulants.

- prCEN/TS 13130-14. Determination of 3,3-bis(3-methyl-4-hydroxyphenyl)-2-indoline in food simulants.
- prCEN/TS 13130-15. Determination of 1,3-butadiene in food simulants.
- prCEN/TS 13130-16. Determination of caprolactam and caprolactam salt in food simulants.
- prCEN/TS 13130-17. Determination of carbonyl chloride in plastics.
- prCEN/TS 13130-18. Determination of 1,2-dihydroxybenzene, 1,3-dihydroxybenzene, 1,4-dihydroxybenzene, 4,4'-dihydroxybenzophenone y 4,4'-dihydroxybiphenyl in food simulants.
- prCEN/TS 13130-19. Determination of dimethylaminoethanol in food simulants.
- prCEN/TS 13130-20. Determination of epichlorohydrin in plastics.
- prCEN/TS 13130-21. Determination of ethylenediamine y hexamethylenediamine in food simulants.
- prCEN/TS 13130-22. Determination of ethylene oxide and propylene oxide in plastics.
- prCEN/TS 13130-23. Determination of formaldehyde and hexamethylene tetramine in food simulants.
- prCEN/TS 13130-24. Determination of maleic acid and maleic anhydride in food simulants.
- prCEN/TS 13130-25. Determination of 4-methyl-1-pentene in food simulants.
- prCEN/TS 13130-26. Determination of 1-octene and tetrahydrofuran in food simulants.
- prCEN/TS 13130-27. Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants.
- prCEN/TS 13130-28. Determination of 1,1,1-trimethylolpropane in food simulants.



Yamashita, H. y Ohkatsu, Y. (2003) A new antagonism between hindered amine light stabilizers and acidic compounds including phenolic antioxidant. *Polymer Degradation and Stability*, 80, 421-426.

## *Capítulo II*

### *Objetivos*

---

Este trabajo se centra en el estudio de envases de poliolefinas de uso alimentario, con el objetivo global de contribuir al conocimiento del comportamiento de los antioxidantes empleados en las principales poliolefinas comerciales en contacto con los distintos tipos de alimentos.

A continuación se exponen de forma más detallada los objetivos específicos que se plantean en cada caso:

- Investigación de una metodología analítica alternativa al método oficial establecido para la determinación de migración global en aceite de oliva, para la etapa de determinación analítica del aceite absorbido por la muestra plástica.
- Separación y cuantificación simultánea de los antioxidantes primarios y secundarios en los simulantes de alimentos por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa y detección UV con red de diodos.
- Desarrollo de la metodología analítica para la etapa de extracción y purificación de antioxidantes a partir de los simulantes de alimentos previa a la separación y cuantificación de los antioxidantes mediante HPLC-UV con red de diodos en los ensayos de migración específica.
- Puesta a punto de la etapa de extracción mediante energía de microndas de los antioxidantes a partir de muestras de poliolefinas, con el fin de determinar los niveles de concentración de antioxidantes presentes en la poliolefina previa a su cuantificación por HPLC-UV.
- Estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes de alimentos en las condiciones de los ensayos de migración.
- Identificación de los antioxidantes utilizados con más frecuencia en poliolefinas comercializadas para uso alimentario, determinando su concentración en la matriz y sus niveles de migración específica en los cuatro simulantes establecidos por la legislación.

- Caracterización de las posibles relaciones existentes entre los niveles de migración y las características de la matriz de poliolefina.



***Capítulo III***  
***Determinación de migración global en***  
***aceite de oliva***

---

## Capítulo III. Determinación de migración global en aceite de oliva

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>79</b>
1.1	Problemática del ensayo de migración global en aceite de oliva .....	79
1.2	Objetivo .....	86
1.3	Material y equipos.....	86
1.4	Reactivos .....	87
<b>2</b>	<b>Metodología experimental.....</b>	<b>87</b>
<b>3</b>	<b>Desarrollo del método analítico .....</b>	<b>92</b>
3.1	Método cromatográfico HPLC-ELSD .....	92
3.2	Método analítico US-HPLC-ELSD .....	95
<b>4</b>	<b>Aplicación a muestras comerciales .....</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Problemática del ensayo de migración global en aceite de oliva

La determinación del nivel de migración global de un material plástico en el simulante graso es considerablemente más compleja que en los simulantes acuosos ya que el simulante graso (aceite de oliva, aceite de girasol o mezcla de triglicéridos sintéticos HB307) no puede ser eliminado por evaporación para determinar por pesada el residuo de la migración. Por otra parte, tampoco puede determinarse directamente la pérdida de masa que ha sufrido la muestra de material plástico tras la exposición al simulante, ya que generalmente ésta absorbe parte del simulante graso, experimentando una ganancia en masa tras el contacto con el simulante. Por ello, es necesario un procedimiento indirecto, en el que se determinan la masa de la muestra plástica antes y después de la exposición al simulante y la cantidad de aceite absorbida por el plástico, que permite corregir el valor de masa final del material analizado [Castle y col., 1992; Ashby, 1994; Tice y Cooper, 1994].

El método establecido por la legislación [UNE-EN 1186-4] para cuantificar el nivel de migración global, se basa en la determinación del aceite absorbido por el plástico mediante las siguientes etapas:

- Extracción del aceite con un disolvente adecuado.
- Metilación de los ésteres derivados de los triglicéridos grasos del simulante.
- Determinación de los ésteres metilados mediante cromatografía de gases.

La realización práctica de este ensayo de migración global, puede encontrarse con varias dificultades, relacionadas principalmente con:

- El acondicionamiento de muestras sensibles a la humedad [Garde, 2002], como los plásticos polares poliamidas y poliésteres, ya que es necesario evitar que la pérdida de agua que ha sufrido el plástico durante el ensayo influya sobre el resultado de migración.
- La extracción del simulante graso absorbido por las muestras, ya que las largas cadenas alquílicas de triglicéridos pueden interactuar con las cadenas poliméricas dificultando la extracción del aceite [Riquet y col., 1998].
- La cuantificación del aceite absorbido por las muestras, especialmente cuando estas absorben una gran cantidad de simulante graso [De Kruijf y Rijk, 1988] como en el caso del poliestireno, ya que la CG no permite medir cantidades superiores a como mucho 200 mg de aceite [Cooper, 1997].
- Las interferencias de los constituyentes de la muestra en el análisis mediante cromatografía de gases [De Kruijf y Rijk, 1988], puesto que algunos plásticos, como por ejemplo aquellos que contienen gliceril oleatos (utilizado ampliamente como aditivo) pueden dar lugar a interferencias que se observan en el blanco de procedimiento.
- Los valores de migración negativos como resultado de errores analíticos y problemas inherentes a los ensayos con aceite [Castle y col., 1992].

Toda esta problemática tiene como consecuencia que el método gravimétrico establecido por la legislación para determinar la migración global resulte lento y muestre una falta de repetibilidad y reproducibilidad tal que la propia normativa acepta un gran margen de error [Riquet y col., 1998] siendo el límite máximo de migración global establecido por la legislación de  $10 \text{ mg dm}^{-2}$  con una tolerancia analítica de  $3 \text{ mg dm}^{-2}$  frente a la tolerancia de  $2 \text{ mg dm}^{-2}$  que se permite para los ensayos en simulantes acuosos [Directiva 2002/72/CE].



La medida de la incertidumbre asociada a la metodología de migración global fue calculada en un estudio interlaboratorio llevado a cabo por Castle y col. (2004), en el que la mayoría de los participantes emplearon el método oficial, en ocasiones con pequeñas modificaciones. Los resultados del 81% de los laboratorios estuvieron dentro de la tolerancia especificada por la legislación y mostraron una incertidumbre asociada a la medida de migración global en aceite de oliva de  $\pm 2,6 \text{ mg dm}^{-2}$  para valores de migración global entre 1,2 y  $15,4 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Lund y col. (2000) propusieron un material de referencia, material plástico coextruido, para llevar a cabo la determinación de migración global con aceite de oliva y certificaron su comportamiento por determinación mediante un estudio interlaboratorio. Los ensayos se realizaron de acuerdo con la norma UNE-EN 1186 durante 10 días a  $40^\circ\text{C}$  en bolsas o celdas. Los resultados dieron un valor de migración global del material de  $8,6 \pm 1,4 \text{ mg dm}^{-2}$  con una desviación estándar para cada laboratorio que oscilaba entre  $0,7 - 1,8 \text{ mg dm}^{-2}$  para los ensayos realizados en bolsa y  $1,8 - 2,6 \text{ mg dm}^{-2}$  para los realizados en celda.

Ante la problemática que presenta el método oficial para la determinación de migración global en aceite de oliva se han desarrollado numerosas investigaciones que pueden sintetizarse en tres líneas principales:

- Métodos que cuantifican directamente el aceite absorbido por el plástico, sin necesidad de llevar a cabo una etapa de extracción.
- Uso de disolventes alternativos al simulante D para el ensayo de migración global.
- Determinación de la migración global mediante la suma de las masas de compuestos individuales.

*Métodos que cuantifican directamente el aceite absorbido por el plástico.*

Reeves (1997) desarrolló un método para medir la migración global basado en la actividad ultravioleta (UV) de los embalajes de poliéster aromático usando la primera derivada de la absorbancia.

Riquet y col. (1998) realizaron un trabajo sobre la interacción entre el simulante y el embalaje en el que estudiaron la concentración del aceite de oliva que penetra en el PP a lo largo del tiempo, proponiendo esta forma de medida como punto de partida para elaborar un método que determine el nivel de migración global mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Esta metodología FTIR para la determinación directa del aceite absorbido también fue estudiada por Rojas de Gante (2002) en films de poliolefinas, recomendándolo para envases flexibles de espesor menor a 35  $\mu\text{m}$ .

*Uso de disolventes alternativos al simulante graso*

La legislación [Directiva 82/711/CEE] permite el uso de etanol al 95%, isooctano u óxido de polifenilo modificado como disolventes alternativos al simulante graso, aunque el alto número de trabajos que investigan el uso de medios volátiles alternativos al aceite de oliva es un índice claro, como afirman Feigenbaum y col. (2002) de que ninguno de los disolventes propuestos en la Directiva es completamente satisfactorio.

Existen discrepancias entre los estudios que comparan el uso de simulantes alternativos frente al simulante graso:

De Kruijf y Rijk (1988) obtuvieron buena concordancia entre los resultados obtenidos con aceite de oliva e isooctano para diferentes matrices poliméricas, entre ellas PP y diferentes tipos de PE. Sin embargo, el trabajo de Czerniawski y Pogorzelska (1997) pone de manifiesto cómo plásticos que con un simulante graso, como el aceite de girasol, no

sobrepasan el límite de migración, sí pueden hacerlo al utilizar isooctano, debido a la mayor interacción que se produce entre el isooctano y el polímero.

Galotto y Guarda (2004) compararon el uso de etanol al 95%, isopropanol y n-heptano como alternativa al aceite de oliva. En las determinaciones en poliolefinas, obtuvieron los resultados más acordes con el aceite de oliva con el empleo de etanol al 95% para film coextruido poliamida/polietileno aunque en los ensayos con altas temperaturas se observa un incremento de los resultados mayor que para el aceite de oliva, mientras que para el PP ninguno de los simulantes alternativos probados resultó adecuado.

Garde y col. (1998) compararon los resultados de migración global a partir de PP en aceite de oliva, etanol al 95% y n-heptano. Los valores menores correspondieron al etanol, los medios al aceite de oliva y los mayores al n-heptano que mostró una mayor capacidad de extracción independientemente del tratamiento térmico con resultados que representan casi el triple de los obtenidos para el aceite de oliva.

La dispersión entre los resultados obtenidos se relaciona con las diferencias existentes en la afinidad polímero-simulante que es un parámetro determinante para decidir si un simulante alternativo resulta adecuado [Galotto y Guarda, 2004]. Un disolvente resultará más agresivo con un material plástico cuanto mayor sea la solubilidad, al favorecer que hinche facilitando la difusión de migrantes potenciales fuera de la matriz. En este sentido al aceite de oliva le corresponden coeficientes de solubilidad distintos a los medios sustitutivos oficiales, isooctano y etanol, que justifican su comportamiento diferente [Feigenbaum y col., 2002].

Por otra parte, el uso de los disolventes volátiles, etanol al 95% e isooctano puede presentar problemas asociados a la diferente selectividad de cada disolvente [Hamdani y Feigenbaum, 1996], de forma que aunque el



valor de migración global fuese el mismo, las sustancias determinadas o la proporción en que se encuentran estas sustancias podrían ser completamente diferentes [Riquet y col., 2002].

Como solución a estos problemas se ha propuesto la realización de dos ensayos, uno con un disolvente polar y otro apolar, o bien el empleo de mezclas de disolventes:

Garde y col. (1998) sugieren la realización de ensayos con dos disolventes, uno polar por ejemplo el etanol, y otro no polar, el isooctano o el heptano, ya que el aceite de oliva generalmente presenta un comportamiento intermedio. Los ensayos tendrían que realizarse con ambos puesto que los plásticos polares darán los mayores valores de migración en alcoholes (mayores que los obtenidos en aceite de oliva) mientras que los plásticos no polares darán a su vez valores mayores para la migración en simulantes apolares.

Riquet y col. (2002) estudiaron el uso de mezclas de disolventes para que su comportamiento fuese más cercano al del aceite de oliva. Estas mezclas estarían compuestas por un componente activo (tert-butil acetato) y un co-disolvente, que presente la menor interacción posible con el polímero: isooctano para polímeros polares y etanol al 95% para polímeros apolares.

#### *Determinación de la migración global mediante la suma de las masas de compuestos individuales*

El desarrollo de esta metodología parte del mayor interés toxicológico que muestra el Scientific Committee for Food (SCF) en la fracción de sustancias con una masa molecular por debajo de 1000 Da [Note for guidance for food contact materials, 2003] por ser la fracción que supuestamente absorbería el tracto intestinal. Aunque esta barrera de 1000 Daltons no se ha fijado desde un punto de vista fisiológico, se sabe que la



velocidad de absorción depende del diámetro molecular y de la polaridad de las moléculas [Schaefer y col., 2004]. En base a estos datos Grob y col. (1999, 2002) propusieron que los niveles límite establecidos por la legislación se modificasen, de manera que junto con el límite de migración global se incluyese un límite para la suma de migrantes menores de 1000 Daltons. Para determinar esta fracción sería necesario el uso de cromatografía de exclusión molecular (SEC), aunque esta técnica separa en función del tamaño y forma de las partículas y no por su masa molecular.

En los últimos años se ha elaborado un método para determinar la fracción de masa de aditivos poliméricos por debajo de 1000 Da basado en la SEC empleando espectrometría de masas o un detector de dispersión de luz, a través de la especificación técnica CEN/TS 14577:2003.

Diferentes autores han desarrollado métodos para la determinación de la fracción de migrantes con masa molecular inferior a 1000 Da utilizando SEC:

Bronz y col. (1998) introdujeron la SEC para determinar la migración global así como los migrantes por debajo de 1000 Da a partir de revestimientos de latas sin lubricantes utilizando detección de fluorescencia, obteniendo una recuperación del 90% comparada con el método gravimétrico.

Runyon y col. (2002) desarrollaron un método para aislar la fracción de migrantes inferior a 1000 Da utilizando como detectores IR, UV y ELSD que en el peor de los casos puede incluir migrantes de hasta 2000 Da.

Schaefer y col. (2004) propusieron un método para la determinación simultánea de migración global y la migración de sustancias por debajo de 1000 Da basado en la separación por SEC seguido por detección UV y ELSD aplicable a simulantes acuosos e isooctano pero no al aceite de oliva.

## 1.2 Objetivo

Teniendo en cuenta que las alternativas existentes al empleo del aceite de oliva como simulantes de alimentos grasos no ofrecen resultados satisfactorios y este sigue siendo el simulante de referencia para todos los ensayos oficiales, en este trabajo se optó por desarrollar un método que permitiese la determinación de la migración global en aceite de oliva a partir de poliolefinas de un modo rápido y preciso. Para ello se puso a punto una metodología analítica que combina la extracción del aceite de oliva absorbido por la muestra plástica mediante energía de ultrasonidos seguida de su determinación mediante HPLC con detector ELSD.

## 1.3 Material y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters (Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.
  - Sistema de mezcla a baja presión.
  - Sistema de desgasificación al vacío en línea de cuatro canales.
  - Inyector automático.
- Sistema de recogida y procesado de datos Millennium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Detector UV con red de diodos Waters (Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Detector Evaporative Light Scattering (ELSD) Eurosep (Cergy-Pontoise, Francia) modelo DDL 31.
- Baño de ultrasonidos Branson (Danbury, USA) modelo 3510.
- Estufa Memmert (Schwabach, Alemania).

## 1.4 Reactivos

- 1,1,2 Tri-cloro-fluor-etano para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania).
- D (+) Glucosa PA-ACS (Panreac Química, Barcelona, España).
- Tetrahidrofurano (THF) para cromatografía en fase líquida (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford MA, USA).
- Aceite de oliva Carbonell con una acidez máxima de 0,4°.

## 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para determinar la migración global en aceite de oliva se realizaron ensayos de una cara utilizando celdas de vidrio como la mostrada en la figura 1. El anillo de vidrio permite un área de contacto entre la muestra de plástico y el simulante de  $1 \text{ dm}^2$  y un volumen de aproximadamente 165 mL. Se emplearon 2 láminas de film, una por cada lado del anillo, para que la relación de la superficie del material plástico en contacto con el simulante ( $2 \text{ dm}^2$  - 165 mL) resultase más próxima a la establecida por la legislación ( $2,5 \text{ dm}^2$  - 125 mL).

El procedimiento experimental se llevó a cabo realizando las siguientes determinaciones [UNE-EN 1186-4]:

- Masa inicial de las muestras de ensayo: antes de llevar a cabo el ensayo de migración es necesario conocer la masa de las láminas de film,  $M_i$ , para lo cual se introducen en el desecador hasta que alcanzan una masa constante, con una variación en la medida inferior a  $2 \text{ mg dm}^{-2}$ .



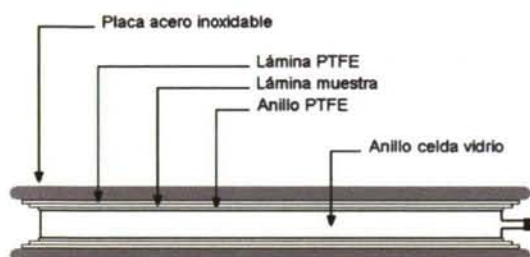


Figura 1. Celda de vidrio empleada en los ensayos de migración global.



- Exposición al simulante: las láminas de film se colocan en la celda de migración, que se llena con el simulante previamente calentado a la temperatura de ensayo. Las celdas se mantienen en las condiciones de contacto siguiendo las indicaciones de la legislación [Directiva 82/711CEE], 10 días a 40 °C, que se corresponden con las condiciones de conservación de un gran número de alimentos. Una vez transcurrido el tiempo de ensayo se recuperan las láminas de film y se les retira la mayor cantidad posible de simulante secándolo entre 2 láminas de papel de filtro hasta que no se observan manchas de aceite en el papel. De todas formas parte del aceite tiende a quedar absorbido en las muestras por lo que tendrá que ser determinado de forma analítica.
- Masa final de las muestras de ensayo: se introduce de nuevo el film en el desecador hasta que alcanza una masa constante,  $M_f$ .
- Determinación analítica del aceite absorbido por el film:  $Ma$ .



- Cálculo de la migración global (MG) del material plástico en el aceite de oliva  $MG = M_i - (M_f - M_a)$ .

El procedimiento analítico para determinar el aceite de oliva absorbido fue modificado respecto al establecido por la norma UNE EN 1186-4 que como ya se ha dicho se basa en la extracción del aceite de oliva mediante Soxhlet y posterior cuantificación por cromatografía de gases (CG) de los ésteres metilados de los ácidos grasos que componen el aceite.

En este trabajo se ha llevado a cabo la extracción del aceite de oliva mediante energía de ultrasonidos y determinación del mismo utilizando HPLC en fase inversa con detector ELSD y glucosa como patrón interno, según el siguiente procedimiento:

- Extracción del aceite de oliva absorbido: cada muestra de film de 1 dm<sup>2</sup> se cortó en cuadrados de aproximadamente 2 x 2 cm que se sometieron a dos extracciones consecutivas en ultrasonidos con 2 x 10 mL de 1,1,2 Triclorofluoretano. La duración de cada extracción fue de 20 min. Ambos extractos se recogieron en un matraz de 25 mL junto con un par de fracciones de disolvente que se emplearon para lavar los fragmentos de film. Se añadió una disolución de glucosa en metanol como patrón interno (concentración final de 150 mg L<sup>-1</sup>) para su análisis cromatográfico y se enrasó hasta 25 mL.
- Determinación del aceite de oliva extraído mediante el procedimiento de HPLC-ELSD descrito en la tabla I. Se ha seleccionado THF como disolvente orgánico para la fase móvil por su compatibilidad con el disolvente de extracción y su capacidad para eliminar de la columna cromatográfica los restos de aceite de oliva. El cromatograma de la figura 2 muestra los picos obtenidos para una disolución patrón de aceite de oliva de concentración 383 mg L<sup>-1</sup> con glucosa (150 mg L<sup>-1</sup>) como patrón interno.

Tabla I. Condiciones de elución mediante HPLC-ELSD para el análisis del aceite de oliva absorbido en el método de determinación de migración global.

Condiciones de elución de la fase móvil			
Tiempo (minutos)	% THF	% H <sub>2</sub> O	Curva
0	50	50	
8	100	0	Lineal
10	50	50	Convexa
13	50	50	Lineal
Columna		Nova Pack C <sub>18</sub> 3,9 x 150 mm 60Å 4 µm	
Flujo		1,0 mL min <sup>-1</sup>	
Temperatura del horno de columna		35 °C	
Volumen inyección		10 µL	
Patrón interno		glucosa (150 mg L <sup>-1</sup> )	
Condiciones del detector ELSD:			
Presión N <sub>2</sub>		1,5 bar	
Temperatura del detector		60 °C	
Potencial del detector		500 V	

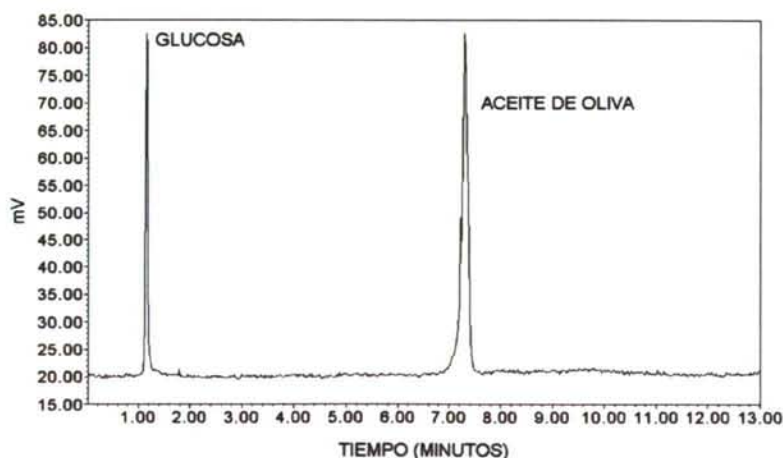
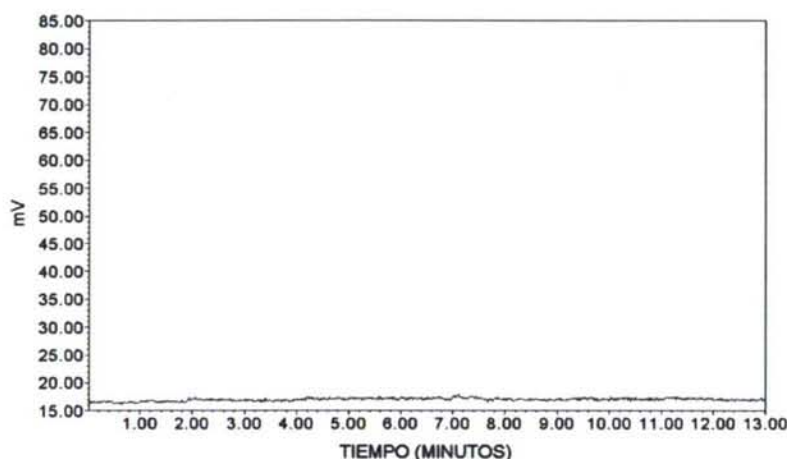


Figura 2. Cromatograma obtenido bajo las condiciones de elución de la tabla I para una disolución patrón de aceite de oliva 383 mg L<sup>-1</sup> con glucosa como patrón interno (150 mg L<sup>-1</sup>).

- Se realizaron blancos de todo el procedimiento para comprobar que no existen interferencias con el método empleado, la figura 3 muestra un ejemplo del blanco obtenido para una muestra de polipropileno.

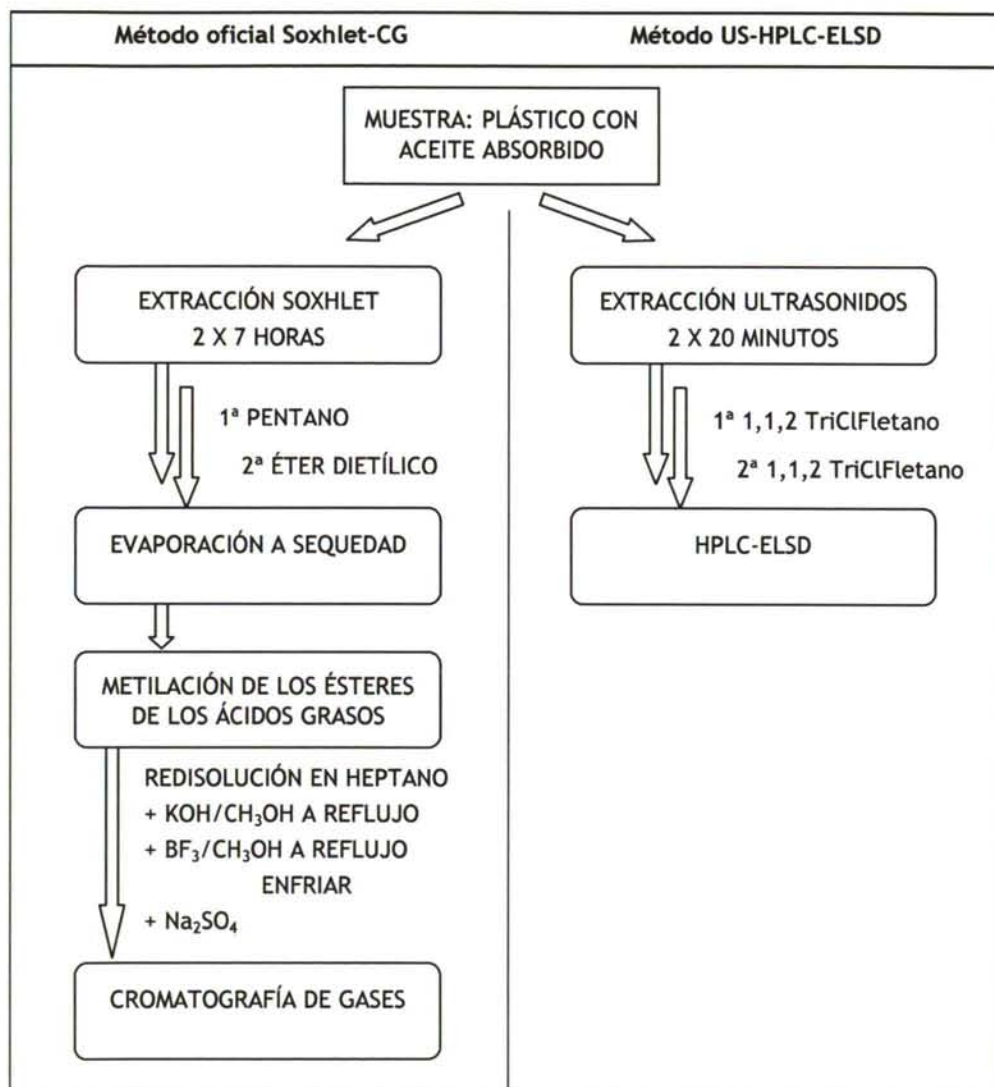


*Figura 3. Cromatograma del blanco de procedimiento de migración global en aceite de oliva para una muestra de PP.*

En la figura 4 se muestra un esquema comparativo del procedimiento utilizado en el método oficial y en el método desarrollado para la determinación del aceite absorbido.

El método US-HPLC-ELSD desarrollado presenta como ventaja frente al método de extracción Soxhlet-CG establecido por la legislación su mayor sencillez y menor tiempo de análisis, como puede verse en la figura 4. En el método oficial sólo la etapa de extracción puede consumir hasta 14 horas de tiempo mientras que el tiempo de extracción mediante ultrasonidos se reduce a menos de una hora.

Figura 4. Determinación aceite absorbido mediante el método oficial y el método desarrollado.



### 3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

#### 3.1 Método cromatográfico HPLC-ELSD

El tipo de detector utilizado, ELSD es un detector universal que a



diferencia del índice de refracción es compatible con la elución en gradiente que no es posible con los detectores de índice de refracción, y proporciona un mejor límite de detección. Este detector ha sido utilizado por diferentes autores para la determinación de ácidos grasos [Bruns y col., 1989; Cao e Ito, 2003; Schaefer y col., 2003]. Sin embargo, tiene como desventaja que puede presentar una alta variabilidad en la respuesta entre días por lo que generalmente requiere que se realice un nuevo calibrado después de cada encendido [Schaefer y col., 2003, 2004].

Para disminuir en lo posible la variabilidad de la respuesta del detector, se introdujo glucosa como patrón interno ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), de manera que la respuesta empleada fue la relación entre las áreas de los picos cromatográficos del aceite y la glucosa:  $A_{\text{aceite}}/A_{\text{glucosa}}$ . Se consiguió disminuir la variabilidad en la respuesta dentro de un mismo día, pero de todas formas se consideró necesario realizar un calibrado diario.

El ELSD generalmente no muestra una respuesta lineal [Schaefer y col., 2003, 2004] por lo que se compararon diferentes alternativas frente a la regresión lineal para la calibración. Por una parte se probó a transformar los datos para conseguir que la relación no lineal cambiase a una lineal y por otra a utilizar la regresión curvilínea [Miller y Miller, 2002]. En la tabla II se muestran los mejores resultados obtenidos después de probar diferentes modelos para una curva de calibrado compuesta por cuatro puntos de la disolución de aceite de oliva en 1,1,2 TriClFletano de concentraciones comprendidas en el intervalo  $150 - 500 \text{ mg L}^{-1}$ , realizando tres réplicas de cada inyección. Como se puede ver, los valores de  $R^2$  ajustado más altos se obtienen con el modelo polinómico y el modelo en función de  $x^2$ . Los residuos muestran un comportamiento similar para ambos modelos y por la complejidad de los cálculos, se descarta el modelo polinómico.

Tabla II. Comparación de varios modelos de regresión para la curva de calibrado HPLC-ELSD.

Regresión simple	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	Error típico
$y = -8,99 \cdot 10^{-1} + 1,37 \cdot 10^{-2} x$	0,98918	0,97848	0,96772	$3,86 \cdot 10^{-2}$
$y = 1,02 + 2,04 \cdot 10^{-5} x^2$	0,99984	0,99968	0,99951	$4,73 \cdot 10^{-2}$
$\log y = -2,50 + 1,21 \log x$	0,99408	0,98820	0,98230	$3,65 \cdot 10^{-2}$
Regresión polinómica	R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup> ajustado	Error típico
$y = 9,00 \cdot 10^{-1} + 8,55 \cdot 10^{-4} x + 1,91 \cdot 10^{-5} x^2$	0,99977		0,99930	$5,66 \cdot 10^{-2}$

Entre los modelos de regresión simple, se obtiene el mejor resultado de R<sup>2</sup> ajustado para la ecuación en función de x<sup>2</sup>, pero los valores en los restantes modelos se aproximan a 0,99. Se comprueba el efecto sobre la cuantificación del empleo de una u otra recta aplicándolas a varias muestras (tabla III) obteniendo diferencias muy pequeñas en los resultados teniendo en cuenta la desviación estándar, por lo que considerando la necesidad de realizar una recta de calibrado diaria, se optó por la recta de regresión lineal de y sobre x.

Tabla III. Cuantificación del nivel de migración (mg dm<sup>-2</sup>) de varias muestras de PEBD utilizando los modelos de regresión simple de la tabla II.

	Nivel de migración (mg dm <sup>-2</sup> )		
	$y = a + b x$	$y = a + b x^2$	$\log y = a + b \log x$
PEBD 1	$6,1 \pm 3,0$	$5,9 \pm 2,1$	$6,3 \pm 2,9$
PEBD 2	$2,1 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,4$
PEBD 3	$3,4 \pm 1,6$	$3,3 \pm 2,5$	$3,4 \pm 2,0$
PEBD 4	$4,5 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,7$
PEBD 5	$4,3 \pm 2,6$	$4,5 \pm 1,9$	$4,4 \pm 2,6$
PEBD 6	$0,63 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,06$

y= Área aceite/Área glucosa

x= nivel de migración

### 3.2 Método analítico US-HPLC-ELSD

Para verificar el método se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:

- Se comprobó que la extracción mediante ultrasonidos fuese completa, para ello se realizó una segunda extracción sobre el material plástico mediante energía de ultrasonidos. La inyección de este segundo extracto en HPLC no presentó en ningún caso un nivel por encima del límite de detección, por lo que se puede afirmar que la extracción ha sido completa.
- Se estudió la recuperación analítica del método sobrecargando diferentes muestras de film de PP de grosor 25 - 50  $\mu\text{m}$  con una cantidad de aceite de oliva conocida. La muestra de film se corta (aproximadamente 1  $\text{dm}^2$  de área), se añade sobre su superficie una cantidad conocida de aceite de oliva, se dobla y se realiza un doble sellado térmico en sus bordes para evitar la pérdida de aceite. Se somete a las condiciones seleccionadas para los ensayos de migración 40 °C y 10 días, al cabo de los cuales se retira de la estufa para la extracción del aceite absorbido mediante el procedimiento anteriormente descrito. Los resultados obtenidos (tabla IV) muestran que para una cantidad añadida de aceite de oliva en el intervalo 6,9-13  $\text{mg L}^{-1}$  se obtuvo una recuperación del  $97 \pm 14 \%$ .

En el método desarrollado, se lleva a cabo la extracción del aceite absorbido en 1  $\text{dm}^2$  de muestra, dilución en 25 mL y determinación cromatográfica del aceite absorbido, con un límite de cuantificación de 100  $\text{mg L}^{-1}$ . De este modo, el método analítico garantiza que se podrá cuantificar una cantidad mínima de 2,5 mg de aceite de oliva absorbido por  $\text{dm}^2$  de muestra, valor que se considera suficiente teniendo en cuenta que es considerablemente inferior al citado límite máximo de migración global de la legislación europea y que el nivel de migración en los simulantes grasos generalmente es mayor que en los simulantes acuosos [Baner y col.,



1994; Tice y Cooper, 1994], como puede verse en los resultados obtenidos por Garde y col. (1998).

Tabla IV. Recuperaciones obtenidas para muestras de PP sobrecargadas con diferentes cantidades de aceite.

Muestra de film	masa aceite añadida (mg)	masa aceite recuperada (mg)	% recuperación
1	6,9	7,6	110
2	13	12	94
3	13	11	84
4	12	11	90
5	9,0	9,2	103
6	9,4	7,5	80
7	7,5	9,0	119
media			97
S			14

#### 4 APLICACIÓN A MUESTRAS COMERCIALES

El método US-HPLC desarrollado para la determinación del aceite absorbido se aplicó para estudiar el nivel de migración global de diferentes muestras comerciales de polipropileno y polietileno de baja densidad en aceite de oliva a 40 °C y 10 días en celdas de vidrio.

La tabla V muestra los resultados obtenidos cuya desviación estándar está dentro de la tolerancia analítica establecida por la legislación ( $\pm 3 \text{ mg dm}^{-2}$ ). Estos valores de desviación son similares a los presentados por Castle y col. (2004) obtenidos en un estudio interlaboratorio en el que obtienen una incertidumbre media de  $\pm 2,6 \text{ mg dm}^{-2}$  para valores de migración global entre 1,2 y 15,4  $\text{mg dm}^{-2}$  en aceite de oliva.



Tabla V. Niveles de migración global en aceite de oliva para diferentes muestras de PP y PEBD mediante el método de US-HPLC-ELSD.

	Migración global (mg dm <sup>-2</sup> )	Desviación estándar (mg dm <sup>-2</sup> )
PP 1	1,4	0,30
PP 2	1,3	1,2
PP 3	2,9	2,3
PP 4	2,5	0,83
PP 5	4,8	0,97
PP 6	7,5	2,7
PP 7	5,0	0,47
PEBD 1	6,1	3,0
PEBD 2	2,1	0,4
PEBD 3	3,4	1,6
PEBD 4	4,5	0,7
PEBD 5	4,3	2,6
PEBD 6	0,63	0,04

En la figura 5 puede verse el cromatograma obtenido para el aceite absorbido por un film de la muestra PP 1, utilizando glucosa como patrón interno.

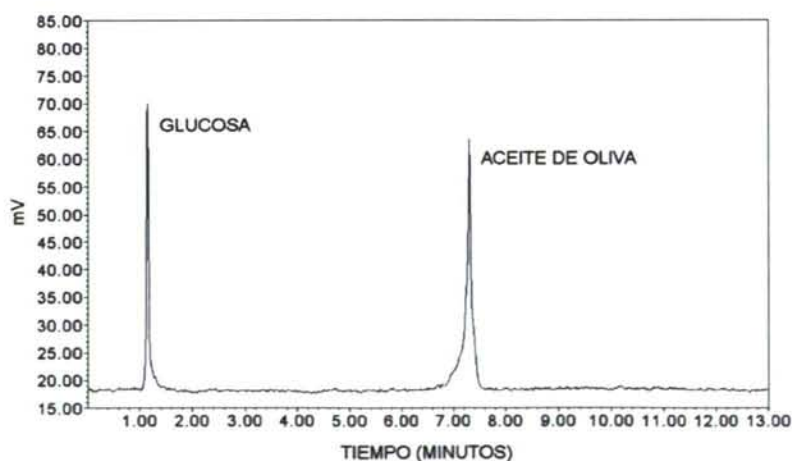


Figura 5. Aceite de oliva absorbido por la muestra de PP 1 en el ensayo de migración global (411 mg L<sup>-1</sup> aceite y 150 mg L<sup>-1</sup> glucosa).

## 5 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método que determina el aceite que permanece absorbido por el material plástico tras el contacto con el simulante aceite de oliva mediante extracción con energía de ultrasonidos y determinación HPLC-ELSD como alternativa al método de extracción Soxhlet y determinación mediante CG establecido por la legislación. El primero se caracteriza por:

- mayor sencillez
- menor tiempo de análisis
- menor volumen de disolvente
- no se han detectado interferencias con el método cromatográfico en ninguna de las muestras analizadas.

El límite de cuantificación obtenido es satisfactorio para la determinación de la migración global según los criterios de la legislación española y europea ya que permite conocer si el nivel de migración global en el simulante D supera el límite de  $10 \text{ mg dm}^{-2}$  establecido por la legislación.

Con el uso de patrón interno y una calibración diaria se corrige la variabilidad debida al uso del detector ELSD de manera que la incertidumbre de la medida obtenida para las muestras analizadas está dentro de los límites establecidos por la legislación,  $\pm 3 \text{ mg dm}^{-2}$ .

El disolvente utilizado 1,1,2 Triclorofluoretano es un disolvente perjudicial para el medioambiente, cuya sustitución por pentano ha sido recomendada recientemente a través de la Directiva UNE-EN-1186, por lo que sería conveniente estudiar el uso de un disolvente alternativo, aunque la cantidad de disolvente empleada en cada extracción es bastante pequeña.

La puesta a punto del método debería estudiarse para matrices de mayor grosor y validarse con el empleo de un material certificado.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashby, R. (1994) The development of European standard (CEN) methods in support of European Directives for plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Food Additives and Contaminants*, 11 (2), 161-168.

Baner, A.L.; Franz, R. y Piringer, O. (1994) Alternative methods for the determination and evaluation of migration potential from polymeric food contact materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 90 (5), 137-142.

Bronz, M.; Biedermann, M. y Grob, K. (1998) Characterization of migrates from can coatings by size exclusion chromatography. Total amounts of phenolics with molecular weight below 1000 D. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 89(3), 327-338.

Bruns, A.; Waldhoff, H. y Winkle, W. (1989) Applications of HPLC with Evaporative Light Scattering Detection in fat and carbohydrate chemistry. *Chromatographia*, 27 (7/8), 340-342.

Cao, Xueli e Ito, Yoichiro (2003) Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1021, 117-124.

Castle, L; Hedgcok, S.E; Kwiatkowsda, C.A; Sharman, M y Smith, I.D. (1992) An improved olive oil overall migration test for plastics using Karl Fischer titration. *Food Additives and Contaminants*, 9 (1), 11-17.

Castle, L.; Macarthur, R.; Mead, E.M. y Read, W.A. (2004). Measurement uncertainty with overall migration testing. *Food Additives and Contaminants*, 21 (3), 256-264.

CEN/TS 14577:2003 Materials and articles in contact with foodstuffs-Plastics- Polymer additives- Test method for the determination of the mass fraction of a polymeric additive that lies below 1000 Daltons.

Cooper, I. (1997) "Practical aspects of migration testing" en Ashby, R.; Cooper, I.; Harvey, S. y Tice, P. "Food packaging migration and legislation". Ed. *Pira International*, Surrey, UK. Cap. 3, 57-96.

Czerniawski, B. y Pogorzelska, Z. (1997) Investigations on overall migration of various plastic materials and articles used in contact with foodstuffs. *Packaging, Technology and Science*, 10, 261-270.

De Kruijf, N. y Rijk, M.A.H (1988) Iso-octane as fatty food simulant: possibilities and limitations. *Food Additives and Contaminants*, 5 (suplemento 1), 467-483.

Directiva 82/711/CEE del Consejo de 18 de octubre de 1982 que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 297, 23/10/1982, p. 26.

Directiva 93/8//CEE de la Comisión de 15 de marzo de 1993, L90, 14/4/1993, p. 22. Enmienda a la Directiva 82/711/CEE.

Directiva 97/48/CE de la Comisión de 29 de julio de 1997, L222, 12/8/1997, p. 10. Enmienda a la Directiva 82/711/CEE.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con



productos alimenticios. DO L 220, 15/8/2002, p.18. Rectificación DO L39 de 13/2/2003, p.1.

Directiva 2004/1/CE de la Comisión de 6 de enero de 2004, L7, 13/1/2004, p. 45. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004, L71, 10/3/2004, p. 8. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

Feigenbaum, A.; Scholler, D.; Bouquant, J.; Brigot, G.; Ferrier, D.; Franz, R.; Lillemark, L.; Riquet, A.M.; Petersen, J.H.; van Lierop, B. y Yagoubi, N. (2002) Safety and quality of food contact materials. Part 1: Evaluation of analytical strategies to introduce migration testing into good manufacturing practice. *Food Additives and Contaminants*, 19 (2), 184-201.

Galotto, M.J. y Guarda, A. (2004) Suitability of alternative fatty food simulants to study the effect of thermal and microwave heating on overall migration of plastic packaging. *Packaging, Technology and Science*, 17, 219-223.

Garde, José A.; Catalá, Ramón y Gavara, Rafael (1998) Global and specific migration of antioxidants from polypropylene films into food simulants. *Journal of Food Protection*, 61 (8), 1000-1006.

Garde, J.A. (2002) "Evaluación práctica de la migración" en Catalá, R. y Gavara, R. "Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos". *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. VII, p. 127-147.

Grob, K.; Spinner, C., Brunner, M. y Etter, R. (1999) The migration from the internal coatings of food cans; summary of the findings and call for more effective regulation of polymers in contact with foods: a review. *Food Additives and Contaminants*, 16 (12), 579-590.

Grob, K. (2002) Comprehensive analysis of migrates from food-packaging materials: a challenge. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 185-191.

Hamdani, M. y Feigenbaum, A. (1996) Migration from a plasticised poly(vinyl chloride) into fatty media: importance of simulant selectivity for the choice of volatile fatty simulants. *Food Additives and Contaminants*, 13 717-730.

Lund, K.H.; Lillemark, L. y Petersen, J.H. (2000) A DANREF certified reference plastic for measurement of overall migration into the food simulant olive oil by single sided testing. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367, 742-747.

Miller, J.N. y Miller, J.C. (2002) Estadística y quimiometría para química analítica. *Pearson educación*, Madrid. Cap. 5. Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. p. 111-156.

Note for guidance for food contact materials (2003): Note for guidance of petitioner when presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation. European Commission. Health & consumer protection directorate-general. [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/note\\_guidance\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/foodcontact/note_guidance_en.pdf) SANCO D3/LR D (2003).

Reeves, B.J. (1997) An ultraviolet spectrophotometric method as an alternative test for determining overall migration from aromatic polyester packaging materials into fatty food oils. *Food Additives and Contaminants*, 14, 591-599.

Riquet, A.M.; Wolf, N.; Laoubi, S.; Vergnaud, J.M. y Feigenbaum, A. (1998) Food and packaging interactions: determination of the kinetic parameters

of olive oil diffusion in polypropylene using concentration profiles. *Food Additives and Contaminants*, 15 (6), 690-700.

Riquet, A.M; Scholler, D. y Feigenbaum, A. (2002) Tailoring fatty food simulants made from solvents mixtures (2): determining the equivalent migration behaviour of olive oil and of solvents in the case of polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 582-593.

Rojas de Gante (2002) "Migración global en simulantes grasos y simulantes grasos alternativos" en Catalá, R. y Gavara, R. "Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos". *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. VIII, p. 149-161.

Runyon, J.; Noti, A.; Grob, K.; Biedermann, M. y Dudler, V. (2002) Isolation of the <1000 Dalton migrants from food packaging materials by Size Exclusion Chromatography. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93, 57-72.

Schaefer, A.; Küchler, T.; Simat, T.J. y Steinhart, H. (2003) Migration of lubricants from food packagings. Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1017, 107-116.

Schaefer, A.; Mab, S.; Simat, T.J. y Steinhart, H. (2004) Migration from can coatings: Part 1. A size-exclusion chromatographic method for the simultaneous determination of overall migration and migrating substances below 1000 Da. *Food Additives and Contaminants*, 21 (3), 287-301.

Tice, P.A. y Cooper, I. (1994) Migration tests for food packaging. *Food Science Reviews*. Vol. 2, p. 3-33.

UNE-EN 1186-4 Versión en español de la Norma Europea EN 1186-1 de abril de 2002 Materiales y artículos en contacto con productos alimenticios.

Plásticos. Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva con una célula.



***Capítulo IV***  
***Separación cromatográfica de***  
***antioxidantes***

---

## Capítulo IV. Separación cromatográfica de antioxidantes

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>109</b>
1.1	Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes .....	109
1.2	Objetivo .....	112
1.3	Material y equipos.....	112
1.4	Reactivos .....	112
<b>2</b>	<b>Separación cromatográfica de antioxidantes en simulantes acuosos.....</b>	<b>114</b>
2.1	Preparación de disoluciones patrón .....	114
2.2	Descripción del método .....	115
2.3	Precisión del método cromatográfico.....	123
2.4	Linealidad, límites de detección y cuantificación. ..	125
<b>3</b>	<b>Separación cromatográfica de antioxidantes en el simulante D .....</b>	<b>128</b>
3.1	Preparación de disoluciones patrón .....	128
3.2	Descripción del método .....	129
3.3	Precisión del método cromatográfico.....	133
3.4	Linealidad, límites de detección y cuantificación ...	134
<b>4</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>137</b>
<b>5</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes

En los últimos años la técnica analítica más utilizada para la determinación de los antioxidantes objeto de estudio en este trabajo ha sido la cromatografía de líquidos (CL) por las ventajas que presenta frente a la cromatografía de gases (CG). La CL generalmente no precisa una compleja etapa de limpieza previa a la inyección ni el uso de patrones internos, además se ve afectada por menos fuentes de error y permite obtener mayores recuperaciones absolutas [Quinto-Fernández y col., 2003] siendo aplicable en un mayor número de casos que la CG. Esta última se ve limitada porque muchos aditivos no son volátiles, tienen masa molecular alta y presentan grupos polares que se descomponen a alta temperatura [El Mansouri y col., 1998; Zhou y col., 1999]. Así por ejemplo, Garde y col. (1998) emplearon CG para determinar Irganox 1076 (531 uma) e Irgafos 168 (647 uma) pero precisaron del uso de HPLC para el análisis del Irganox 1010 (1178 uma).

La cromatografía de gases se ha utilizado generalmente con un detector de fotoionización de llama (FID) y en menor medida acoplada a un detector de masas [Di Pasquale y Galli, 1984; Di Pasquale y col., 1985; Baylocq y col., 1989; Cortes y col., 1989; Garde y col., 1998, 2001; Marque y col., 1998; Helmroth y col., 2002; Moskovkin, 2002].

Dentro de la CL, la fase inversa es la más empleada, aunque también han sido aplicadas al estudio de antioxidantes la cromatografía de exclusión molecular (SEC) [Baylocq y col., 1989], la CL en fase normal [Schabron y Feska, 1980; Schabron y col., 1982] y la cromatografía líquida con columna capilar [Bruheim y col., 2000; Molander y col., 1999, 2002].

La SEC presenta buena reproducibilidad en los tiempos de retención de los picos cromatográficos pero tiene como inconvenientes su pobre

resolución y baja sensibilidad debido a la anchura de los picos [Haney y Dark, 1980 y Munteanu y col., 1987].

Los trabajos de Dilettato y Arpino (1989) y Arpino y col. (1990) que utilizan CL en fase normal ponen de manifiesto que esta técnica tiene problemas de falta de resolución para compuestos débilmente retenidos y de acumulación de material polar en la fase estacionaria, lo que disminuye su capacidad de absorción pudiendo llegar a modificarse los tiempos de retención de los compuestos. Nielson (1991, 1993) comparó la utilización de fase inversa y fase normal recomendando la fase normal únicamente para la determinación de ésteres fosfito con el objeto de evitar la posibilidad de hidrólisis de los mismos en la fase móvil polar propia de la CL en fase inversa, o para determinaciones de mezclas muy sencillas ya que la CL en fase normal permite tiempos de análisis menores que la fase inversa.

En general, la CL en fase inversa es con diferencia la técnica más ampliamente utilizada, con elución en gradiente o isocrática empleando mayoritariamente una columna de octadecilsílice (C<sub>18</sub> u ODS) como fase estacionaria y como fase móvil mezclas polares con acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano o propanol y agua. Esta técnica permite una selectividad mucho mayor con una alta reproducibilidad de los tiempos de retención [Munteanu y col., 1987; Haney y Dark, 1980].

Aunque en ocasiones algunos autores han utilizado el detector UV combinado con otro de refracción [Haney y Dark, 1980; Munteanu y col., 1987; El Mansouri y col., 1998] o de ELSD [Marcato y Vianello, 2000], la mayoría de los autores generalmente utilizan sólo el detector UV [Vadakkoot y col., 1983; Baylocq y col., 1985; Hirata y Okamoto, 1989; Castle y col., 1995; Macko y col., 1995; Pinto y Taylor, 1998; Spyropoulos, 1998; Salafranca y col., 1999; Zhou y col., 1999; Thilén y Shishoo, 2000; Marcato y col., 2003]. En menor medida se han utilizado otro tipo de detectores, como fluorescencia [Cooper y col., 1998], detector de carbono



14 [Goydan y col., 1990], espectrometría de masas (EM) [Allen y col., 1994; Yu y col., 2000] o el análisis múltiple con varios de estos detectores en serie, como el estudio de Loudon y col. (2002) que emplea UV con red de diodos, IR, RMN- $H^+$  y EM.

En los últimos años se han publicado algunos trabajos que emplean cromatografía líquida con columna capilar y temperatura programada con detección UV [Molander y col., 1999; Bruheim y col., 2000], infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) [Bruheim y col., 2000] o ELSD [Molander y col., 2002], técnica que aporta una mayor sensibilidad que la CL tradicional unida a la ventaja de que la temperatura programada elimina el uso de disolventes en la fase móvil en los que muchos aditivos son poco solubles.

Por otra parte se ha aplicado al estudio de aditivos la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) con dióxido de carbono como fase móvil como alternativa a la CG ya que permite la separación con alta resolución de compuestos no volátiles, lábiles térmicamente y de alta masa molecular y moderadamente polares, y es una técnica de separación compatible con los detectores universales de ionización de llama o espectrometría de masas [Berg y col., 1992, 1993; Dilettato y Arpino, 1989]. Sin embargo, el uso del CL para la determinación de aditivos es mucho más común en el laboratorio que el empleo de SFC como ya se ha dicho, debido a que el tiempo de análisis con esta última técnica puede ser muy elevado, por ejemplo Arpino y col. (1990) emplean SFC capilar-FID y MS para el análisis de antioxidantes obteniendo buenos resultados pero necesitan 72 minutos para eluir el Irganox 1010 frente a tiempos inferiores a 20 minutos alcanzados con CL en fase inversa [Nielson, 1991, 1993].

Por último otras técnicas menos utilizadas son el RMN- $H^+$  [Marque y col., 1998] y la electroforesis capilar a las que se ha recurrido como complementarias de la CL para el análisis de los antioxidantes BHA y BHT [Hall III y col., 1994; Summanen y col., 1995].

## 1.2 Objetivo

Separación y cuantificación simultánea de los antioxidantes primarios y secundarios en los simulantes de alimentos por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa y detección UV con red de diodos.

## 1.3 Material y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters (Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.
  - Sistema de mezcla a baja presión.
  - Sistema de desgasificación al vacío en línea de cuatro canales.
  - Inyector automático.
- Detector UV con red de diodos Waters (Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Sistema de recogida y procesado de datos Millenium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,9 x 150 mm empacada con relleno Nova Pack C<sub>18</sub> 60 Å, 4 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,0 x 150 mm empacada con relleno Symmetry C<sub>18</sub>, 3,5 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).

## 1.4 Reactivos

- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).

- THF para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Metanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford MA, USA).
- Aceite de oliva Carbonell con una acidez máxima de 0,4°.
- Antioxidantes:
  - 2,2'-metilenbis(4-metil-6-terc-butifenol) (AO 2246) CAS N° [119-47-1]; 2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butilfenol) (AO 425) CAS N° [88-24-4]; BHA, mezcla de isómeros 2[3]-t-butil-4-hidroxianisol; 2[3]-t-butilhidroquinona monometil éter, mínimo 90% isómero-3 /9%- isómero-2-) CAS N° [25013-16-5]; 2, 6 di-terc-butil-p-cresol (BHT, 99%) CAS N° [128-37-0] y 1,3,5-trimetil-2,4,6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno (Ethanox 330, 99%) CAS N° [1709-70-2] de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
  - 2,4-di-terc-butil-fenol (DBP, ≥98%) CAS N° [96-76-4] de Fluka (Buchs, Suiza).
  - Fosfito de tris(2, 4-di-terc-butilfenilo) (Irgafos 168) CAS N° [31570-04-4]; tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol (Irganox 1010) CAS N° [6683-19-8] y 3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-propionato de octadecilo (Irganox 1076) CAS [2082-79-3] de Ciba (Basel, Suiza).

## 2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ANTIOXIDANTES EN SIMULANTES ACUOSOS

### 2.1 Preparación de disoluciones patrón

Se prepararon disoluciones patrón individuales de cada antioxidante ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) en acetonitrilo (ACN) para AO 2246, AO 425, BHA, BHT, DBP e Irganox 1010, en tetrahidrofurano (THF) para Irgafos 168 e Irganox 1076 y en una mezcla de metanol:THF (75:25) para Ethanox 330.

El antioxidante fosfito Irgafos 168 tiende a degradarse vía oxidación dando lugar al derivado fosfato y en menor medida vía hidrólisis para dar lugar al DBP [Marcato y col., 2000], de manera que si el compuesto se disuelve en ciertos disolventes polares puede presentar problemas de inestabilidad tendiendo a oxidarse [El Mansouri y col., 1998]. De acuerdo con Garde y col. (1998, 2001) el Irgafos 168 disuelto en THF se oxida completamente una vez transcurridas 24 horas, por lo que teniendo en cuenta que el uso de THF ya resulta necesario desde el primer momento para solubilizar algunos de los compuestos estudiados y que todavía están por determinar los disolventes a utilizar en la metodología de determinación de la migración específica, se decidió determinar el Irgafos 168 como su derivado oxidado, obtenido según el método descrito de disolución en THF.

Las disoluciones de trabajo de concentración conocida, mezcla de todos los compuestos, se prepararon a partir de las disoluciones individuales de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  por dilución en acetonitrilo.



## 2.2 Descripción del método

### *Primeros ensayos con columna Nova Pack C<sub>18</sub>*

En los primeros ensayos, con el fin de desarrollar un método cromatográfico que permita la separación y cuantificación de antioxidantes en muestras acuosas se utilizó una columna Nova Pack C<sub>18</sub> y elución con gradiente metanol-agua (Tabla I). Cada antioxidante se identificó por su tiempo de retención y por su espectro UV.

*Tabla I. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con una columna Nova Pack C<sub>18</sub>.*

Condiciones de elución de la fase móvil			
Tiempo (minutos)	Metanol (%)	Agua (%)	Curva
0	20	80	lineal
5	60	40	lineal
9	100	0	lineal
17	100	0	lineal
18	20	80	convexa
20	20	80	lineal
Columna		Nova Pack C <sub>18</sub> 3,9 x 150 mm 60 Å, 4 µm	
Flujo		1,0 mL min <sup>-1</sup>	
Temperatura del horno de columna		30 °C	
Volumen de inyección		20 µL	
Intervalo de λ medido		200-400 nm	
Longitud de onda cuantificación		276 nm	

La figura 1 muestra un cromatograma a 276 nm obtenido para una disolución patrón de 5 mg L<sup>-1</sup> de antioxidantes eluido bajo las condiciones de la tabla I, en el que se han identificado los picos cromatográficos correspondientes a cada antioxidante. En la parte superior de la figura se presenta el espectro de cada compuesto recogido en un intervalo de

longitudes de onda de 200 a 400 nm, junto con el tiempo de retención al que es eluido.

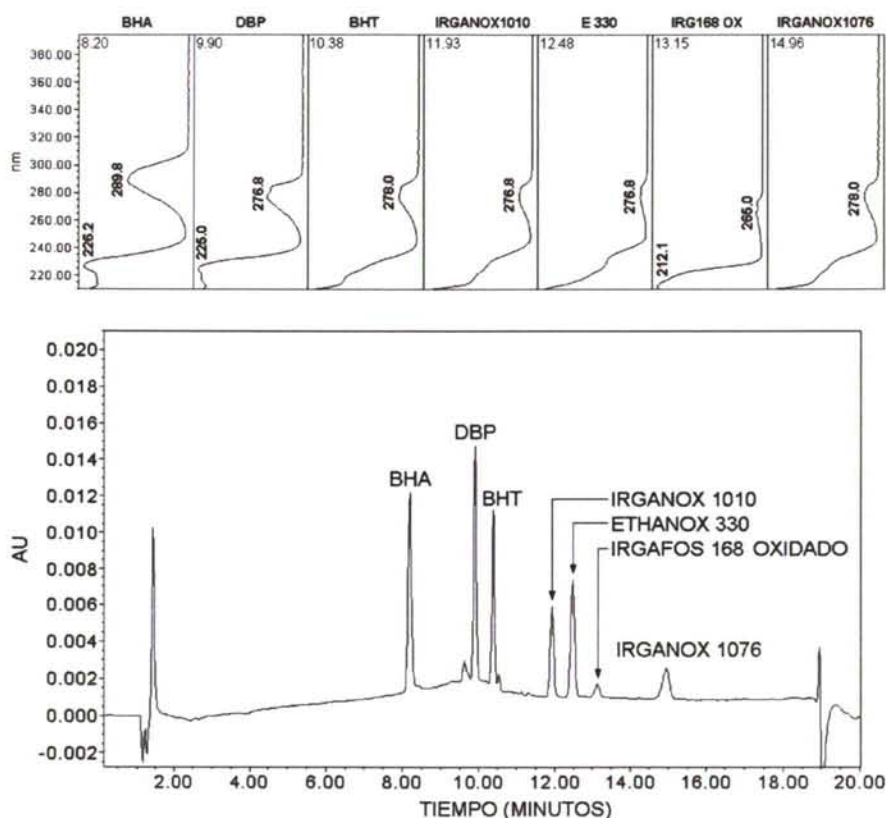


Figura 1. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de antioxidantes de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  con columna Nova Pack  $C_{18}$  (276 nm).

Los compuestos estudiados presentan un máximo de absorbancia en torno a 212-230 nm y un segundo máximo, de menor intensidad, en torno a 265-290 nm. Los cromatogramas extraídos a una longitud de onda correspondiente a este segundo máximo de absorbancia mostraron una mejor relación señal/ruido y una menor presencia de interferencias, por lo que para llevar a cabo el análisis cuantitativo de los compuestos se seleccionó la longitud de onda de 276 nm.

En primer lugar eluyen los compuestos de menor masa molecular y más polares BHA, DBP, BHT, entre 8 y 10 minutos, mientras que los compuestos de mayor masa molecular y menos polares eluyen de forma más lenta, precisando una fase móvil del 100 % en metanol y siendo el último compuesto el Irganox 1076 con un tiempo de retención en torno a 15 minutos.

Para confirmar la correcta separación de los compuestos con las condiciones de análisis utilizadas se calcularon los parámetros cromatográficos descritos en la tabla II, que se muestran en la tabla III.

Los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos indican la buena resolución y eficacia de la columna para la separación de los antioxidantes, aunque los resultados de  $k'$  y  $R_s$  de algunos compuestos muestran que sus tiempos de elución resultan un poco largos:

- Los valores de  $k'$  están comprendidos en el rango de 5 a 10 pero sólo el BHA pertenece al “rango ideal” de 1 a 5.
- $R_s$  alcanza unos valores bastante altos para DBP e Irganox 1010 (superior a 5) e Irganox 1076 (superior a 3,5) lo que indica que aunque estos compuestos están bien separados, podría disminuirse su tiempo de análisis.

Por otra parte, los valores de  $\alpha$  indican que tres de los compuestos analizados, DBP, Irganox 1010 e Irganox 1076, se separan con mayor facilidad mientras que la separación de los demás compuestos es más difícil en estas condiciones de análisis.

Tabla II. Definición de los parámetros cromatográficos utilizados para caracterizar las condiciones de análisis.

Símbolo	Nombre	Fórmula	Significado
$t_R$	Tiempo de retención	$t_R = t_R' + t_M$ $t_M$ = tiempo de retención de la fase móvil $t_R'$ = <i>tiempo de retención ajustado</i> , tiempo que el soluto permanece retenido en la fase estacionaria.	Las diferencias de esta magnitud para distintos solutos reflejan la facilidad de su separación en el sistema [Dabrio y col., 2000].
$k'$	Factor de retención	$k' = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	Idealmente las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los valores de $k'$ para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5 [Skoog y Leary, 1994].
$\alpha$	Factor de selectividad	$\alpha = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{t'_R(j)}{t'_R(i)}$	Representa la facilidad con que un par de sustancias, "i" y "j" se pueden separar en el sistema cromatográfico. Cuanto más difiere de la unidad, mejor será la separación. Si $\alpha > 1,14$ se considera que la separación es fácil, si $\alpha < 1,01$ , se estima que la separación es muy difícil [Dabrio y col., 2000].
$R_s$	Resolución	$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$ $w_b$ = anchura del pico en su base	Es una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos [Skoog y Leary, 1994].  $R_s = 1$ supone las mejores condiciones ya que las sustancias estarán perfectamente separadas en el menor tiempo posible (Dabrio y col., 2000).
$N$	Número de platos	$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2$	Mide la eficacia de la columna, que es mayor cuanto mayor es el número de platos teóricos (Skoog y Leary, 1994). Las separaciones tendrían que ser hechas en el rango de eficacia de $N = 10^3 - 10^6$ [Poole, 2003].



Tabla III. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes con columna Nova Pack C<sub>18</sub>.

	$t_R'$	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N
BHA	6,76	4,73			7984
DBP	8,46	5,92	1,25	5,24	19511
BHT	8,95	6,26	1,06	1,89	31675
Irganox 1010	10,5	7,34	1,17	5,32	18601
Ethanox 330	11,0	7,72	1,05	1,42	14349
Irgafos 168 ox	11,7	8,18	1,06	1,58	15906
Irganox 1076	13,5	9,45	1,16	3,51	9407

#### Método elución con columna Symmetry C<sub>18</sub>

La columna Nova Pack C<sub>18</sub> se sustituyó por una columna Symmetry C<sub>18</sub> de la misma longitud y menor diámetro, con un relleno esférico de menor tamaño de partícula. Con la disminución del volumen de columna se busca mejorar la sensibilidad del método alcanzando límites de detección inferiores al incrementarse el área de los picos cromatográficos, mientras que el menor tamaño de partícula debería aumentar la eficacia de la columna para separar los picos cromatográficos con mayor resolución. Por otra parte, el relleno de la columna Symmetry se caracteriza por una mayor densidad de grupos enlazados con menor actividad residual silanol, que proporciona mayor reproducibilidad y permite trabajar a pH neutro o ácido sin comprometer la forma de los picos.

Las condiciones del gradiente de elución fueron modificadas para mantener la buena separación de los picos obtenida con la columna Nova Pack C<sub>18</sub> hasta alcanzar las condiciones que se describen en la tabla IV. Debido al menor tamaño de partícula de la columna Symmetry C<sub>18</sub> fue necesario reducir el flujo de fase móvil hasta 0,5 mL min<sup>-1</sup> para evitar trabajar a altas presiones, lo que proporciona la ventaja adicional de reducir el volumen de disolvente consumido.

Tabla IV. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con una columna Symmetry C<sub>18</sub>.

Condiciones de elución de la fase móvil			
Tiempo (minutos)	Metanol (%)	Agua (%)	Curva
0	50	50	
5	100	0	lineal
22	100	0	lineal
23	50	50	convexa
25	50	50	lineal
Columna		Symmetry C <sub>18</sub> 3.0 x 150 mm 3.5 µm	
Flujo		0,5 mL min <sup>-1</sup>	
Temperatura del horno de columna		30 °C	
Volumen de inyección		20 µL	
Intervalo de λ medido		200-400 nm	
Longitud de onda cuantificación		276 nm	

La figura 2 muestra un cromatograma obtenido bajo estas condiciones de elución para una disolución patrón de 9 antioxidantes (en esta mezcla se han incluido los antioxidantes AO 2246 y AO 425, a diferencia de la anterior) de concentración 5 mg L<sup>-1</sup>.

De nuevo eluyen en primer lugar el grupo de compuestos de menor masa molecular y más polares: BHA, DBP y BHT al que ahora se han sumado el AO 2246 y el AO 425 (figura 2) mientras que los de mayor masa molecular y menos polares eluyen de forma más lenta siendo el tiempo de retención del último compuesto, Irganox 1076, 18,4 minutos.

Comparando ambos cromatogramas (figura 1 y 2) se observa que con el uso de la columna Symmetry se ha aumentado considerablemente la relación señal/ruido de los picos correspondientes a los compuestos estudiados, de forma que el área de los picos cromatográficos para igual concentración prácticamente se ha duplicado, con la consiguiente mejoría en la sensibilidad del método. Por otra parte, se ha reducido el flujo de

fase móvil frente a la Nova Pack hasta la mitad, con el consiguiente ahorro de reactivos y residuos generados, mientras que el último compuesto en ser eluido experimenta un retraso de tan sólo 3 minutos.

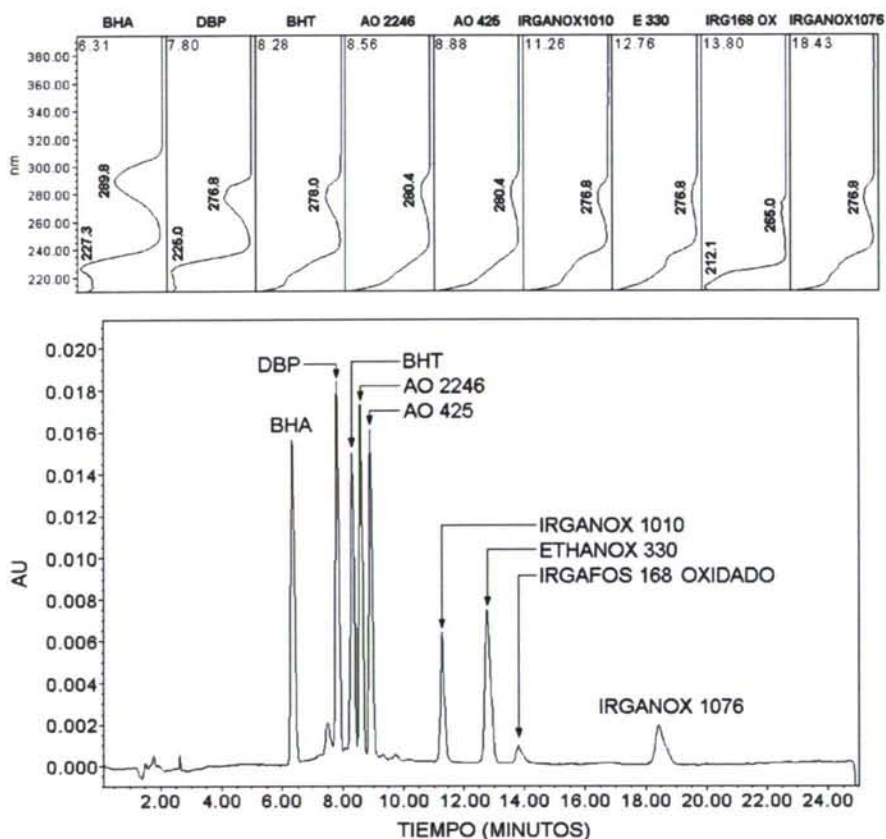


Figura 2. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de antioxidantes de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $276 \text{ nm}$  con columna Symmetry  $C_{18}$ .

Al igual que para el método anterior se calcularon los parámetros cromatográficos correspondientes a las nuevas condiciones de elución que se muestran en la tabla V para comprobar la eficacia de la separación.

Si se comparan los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos con la columna Symmetry frente a los de la columna Nova Pack se observa que los valores de  $k'$  se han reducido notablemente para la mayor parte de los antioxidantes, de manera que los compuestos de baja



masa molecular se encuentran en el rango considerado ideal (1-5) teniendo en cuenta la resolución y el tiempo de análisis, mientras que los de mayor masa molecular son algo superiores (5-10). Los valores de  $\alpha$  y  $R_s$  son similares a los obtenidos con el método anterior, y únicamente el AO 2246, que no se había analizado con el método anterior muestra un valor de  $\alpha$  inferior a 1,01, lo que indica la dificultad de su separación.

Tabla V. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub>.

	$t_R'$	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N
BHA	4,55	2,60			3380
DBP	6,06	3,47	1,33	3,94	8782
BHT	6,55	3,75	1,08	1,59	13733
AO2246	6,82	3,90	1,04	0,91	13047
AO 425	7,14	4,08	1,05	1,08	14049
Irganox 1010	9,45	5,40	1,32	5,33	6250
Ethanol 330	10,9	6,25	1,16	2,28	4787
Irgafos 168 ox	11,9	6,83	1,09	1,66	12841
Irganox 1076	16,4	9,40	1,38	6,74	7324

Por lo tanto, los parámetros cromatográficos  $k'$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$  y N indican que la columna cromatográfica Symmetry C<sub>18</sub> permite llevar a cabo la separación de los antioxidantes con buena resolución y eficacia a pesar de haber aumentado la mezcla de analitos en dos compuestos.

Aunque ambas columnas resultarían adecuadas para la determinación de los antioxidantes se ha optado por la utilización de la columna Symmetry C<sub>18</sub> ya que permite incrementar la respuesta de los antioxidantes en gran medida para igual concentración, lo que se traduce en una mayor sensibilidad del método, a la vez que mantiene e incluso mejora la eficacia y resolución de la separación cromatográfica con una reducción del flujo de fase móvil a la mitad y aumentando el tiempo de análisis en sólo 5 minutos.



### ***Determinación del Irgafos 168***

Como se indicó anteriormente, debido a la inestabilidad del Irgafos 168, en el método analítico puesto a punto se determinó su derivado oxidado, pero también se comprobó si podría determinarse el compuesto fosfito sin degradar.

Según el estudio de Nielson (1993) para la determinación del Irgafos 168 utilizando CL en fase inversa, el tiempo de análisis con fase acuosa debe ser inferior a 7 minutos para evitar la hidrólisis de este tipo de compuestos, ésteres fosfito. Por lo tanto, de acuerdo con los datos de la tabla IV que indican la duración de la fase acuosa de 5 minutos, el método propuesto resultaría también adecuado para la determinación del fosfito.

Para confirmar este hecho se analiza una disolución que contiene el fosfito Irgafos 168 disuelto en diclorometano con lo que se comprueba que el método permite identificar este compuesto, que eluye al final del cromatograma. Su determinación se describirá con más profundidad en el capítulo VI.

### **2.3 Precisión del método cromatográfico**

La precisión del método cromatográfico desarrollado con la columna Symmetry C<sub>18</sub> se evalúa mediante el estudio de la repetibilidad (tabla VI) y reproducibilidad del método (tabla VII).

Para llevar a cabo el estudio de repetibilidad se realizaron 6 inyecciones de una disolución patrón de 5 mg L<sup>-1</sup> en un mismo día mientras que en el estudio de reproducibilidad estas inyecciones se realizaron en días diferentes en el mismo laboratorio. Los resultados obtenidos en área y tiempo de retención muestran la buena precisión del método utilizado ya que la variabilidad es inferior al 3,5 % en área y al 0,3% en  $t_R$  para las inyecciones realizadas el mismo día y al 7,5 % en área y al 2,3% en  $t_R$  para las realizadas en días diferentes.

Tabla VI. Repetibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en acetonitrilo con columna Symmetry C<sub>18</sub>.

n = 6	Áreas				t <sub>R</sub>			
	A media	S <sub>r</sub>	CV	r	t <sub>R</sub> medio	S <sub>r</sub>	CV	r
BHA	134831	7,0.10 <sup>2</sup>	0,5	2,0.10 <sup>3</sup>	6,21	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,21	3,7.10 <sup>-2</sup>
DBP	115283	1,5.10 <sup>3</sup>	1,3	4,3.10 <sup>3</sup>	7,71	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,17	3,7.10 <sup>-2</sup>
BHT	92693	1,8.10 <sup>3</sup>	1,9	5,0.10 <sup>3</sup>	8,21	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,16	3,8.10 <sup>-2</sup>
AO2246	135856	6,6.10 <sup>2</sup>	0,48	1,8.10 <sup>3</sup>	8,48	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,15	3,7.10 <sup>-2</sup>
AO 425	163834	1,8.10 <sup>3</sup>	1,1	5,0.10 <sup>3</sup>	8,80	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,15	3,7.10 <sup>-2</sup>
Irganox 1010	66023	2,7.10 <sup>2</sup>	0,41	7,6.10 <sup>2</sup>	11,1	1,3.10 <sup>-2</sup>	0,12	3,6.10 <sup>-2</sup>
Ethanox 330	100659	9,4.10 <sup>2</sup>	0,93	2,6.10 <sup>3</sup>	12,6	1,2.10 <sup>-2</sup>	0,10	3,5.10 <sup>-2</sup>
Irgafos 168 ox	12757	4,4.10 <sup>2</sup>	3,4	1,2.10 <sup>3</sup>	13,5	1,1.10 <sup>-2</sup>	0,078	2,9.10 <sup>-2</sup>
Irganox 1076	35304	8,4.10 <sup>2</sup>	2,4	2,4.10 <sup>3</sup>	17,9	1,4.10 <sup>-2</sup>	0,079	4,0.10 <sup>-2</sup>

r = límite de repetibilidad = 2,8 x S<sub>r</sub> [UNE 82009: 1999]

Tabla VII. Reproducibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub>.

n = 6	Áreas				t <sub>R</sub>			
	A media	S <sub>R</sub>	CV	R	t <sub>R</sub> medio	S <sub>R</sub>	CV	R
BHA	126907	6,1.10 <sup>3</sup>	4,8	1,7.10 <sup>4</sup>	6,33	7,9.10 <sup>-2</sup>	1,2	2,2.10 <sup>-1</sup>
DBP	132326	6,6.10 <sup>3</sup>	5,0	1,8.10 <sup>4</sup>	7,81	8,0.10 <sup>-2</sup>	1,0	2,3.10 <sup>-1</sup>
BHT	108252	5,4.10 <sup>3</sup>	5,0	1,5.10 <sup>4</sup>	8,31	8,4.10 <sup>-2</sup>	1,0	2,3.10 <sup>-1</sup>
AO2246	125399	6,2.10 <sup>3</sup>	4,9	1,7.10 <sup>4</sup>	8,58	8,7.10 <sup>-2</sup>	1,0	2,4.10 <sup>-1</sup>
AO 425	120365	5,8.10 <sup>3</sup>	4,8	1,6.10 <sup>4</sup>	8,91	9,6.10 <sup>-2</sup>	1,1	2,7.10 <sup>-1</sup>
Irganox 1010	63889	3,2.10 <sup>3</sup>	4,9	8,8.10 <sup>3</sup>	11,3	1,8.10 <sup>-1</sup>	1,6	5,0.10 <sup>-1</sup>
Ethanox 330	94623	4,3.10 <sup>3</sup>	4,6	1,2.10 <sup>4</sup>	12,8	2,2.10 <sup>-1</sup>	1,7	6,2.10 <sup>-1</sup>
Irgafos 168 ox	11286	7,8.10 <sup>2</sup>	6,9	2,2.10 <sup>3</sup>	13,8	2,4.10 <sup>-1</sup>	1,7	6,8.10 <sup>-1</sup>
Irganox 1076	38692	2,9.10 <sup>2</sup>	7,4	8,0.10 <sup>3</sup>	18,5	4,0.10 <sup>-1</sup>	2,2	1,1.10 <sup>0</sup>

R = límite de reproducibilidad = 2,8 x S<sub>R</sub> [UNE 82009: 1999]

## 2.4 Linealidad, límites de detección y cuantificación

Para evaluar la linealidad del calibrado se inyectaron dos réplicas de cada uno de los 5 puntos establecidos en el intervalo de 2,5 a 20 mg L<sup>-1</sup> para todos los antioxidantes excepto para el AO 2246 y el AO 425 cuyo intervalo estuvo comprendido entre 0,5 y 15 mg L<sup>-1</sup>.

En la tabla VIII y en la figura 3 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto junto con el coeficiente de correlación lineal R, que confirma la linealidad del intervalo seleccionado, su error estándar (Sy/x), error estándar relativo (RSD) y los límites de detección (x<sub>LD</sub>) y cuantificación (x<sub>LC</sub>) del método cromatográfico calculados de acuerdo con Miller y Miller (2002).

Tabla VIII. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub>.

	Ecuación: $y = Ax + B$	R	R <sup>2</sup>	RSD	S <sub>y/x</sub>	x <sub>LD</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	x <sub>LC</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
BHA	$y = 2,55 \cdot 10^4 x - 4,57 \cdot 10^3$	0,99992	0,99984	69	2673	0,32	1,05
DBP	$y = 2,71 \cdot 10^4 x - 1,47 \cdot 10^3$	0,99991	0,99982	68	3030	0,34	1,12
BHT	$y = 2,13 \cdot 10^4 x - 3,08 \cdot 10^3$	0,99990	0,99979	69	2736	0,39	1,29
AO 2246	$y = 2,68 \cdot 10^4 x - 8,53 \cdot 10^2$	0,99987	0,99974	121	3107	0,35	1,16
AO 425	$y = 2,53 \cdot 10^4 x - 1,25 \cdot 10^3$	0,99987	0,99974	121	2737	0,33	1,08
Irganox 1010	$y = 1,21 \cdot 10^4 x - 1,48 \cdot 10^3$	0,99994	0,99989	69	1115	0,28	0,92
Ethanox 330	$y = 2,01 \cdot 10^4 x - 3,06 \cdot 10^3$	0,99994	0,99987	69	1881	0,28	0,94
Irgafos 168 ox	$y = 2,59 \cdot 10^3 x - 3,90 \cdot 10^2$	0,99991	0,99982	69	306	0,36	1,18
Irganox 1076	$y = 8,12 \cdot 10^3 x - 1,28 \cdot 10^3$	0,99991	0,99982	69	928	0,34	1,14

x<sub>LD</sub> concentración correspondiente a  $y_{LD} = y_b + 3 S_b$

x<sub>LC</sub> concentración correspondiente a  $y_{LC} = y_b + 10 S_b$

donde y<sub>b</sub> = área del blanco y S<sub>b</sub> = desviación estándar del blanco. En este caso se ha considerado:

y<sub>b</sub> = B (ordenada en el origen de la recta de calibrado)

S<sub>b</sub> = S<sub>y/x</sub> [Miller y Miller, 2002]

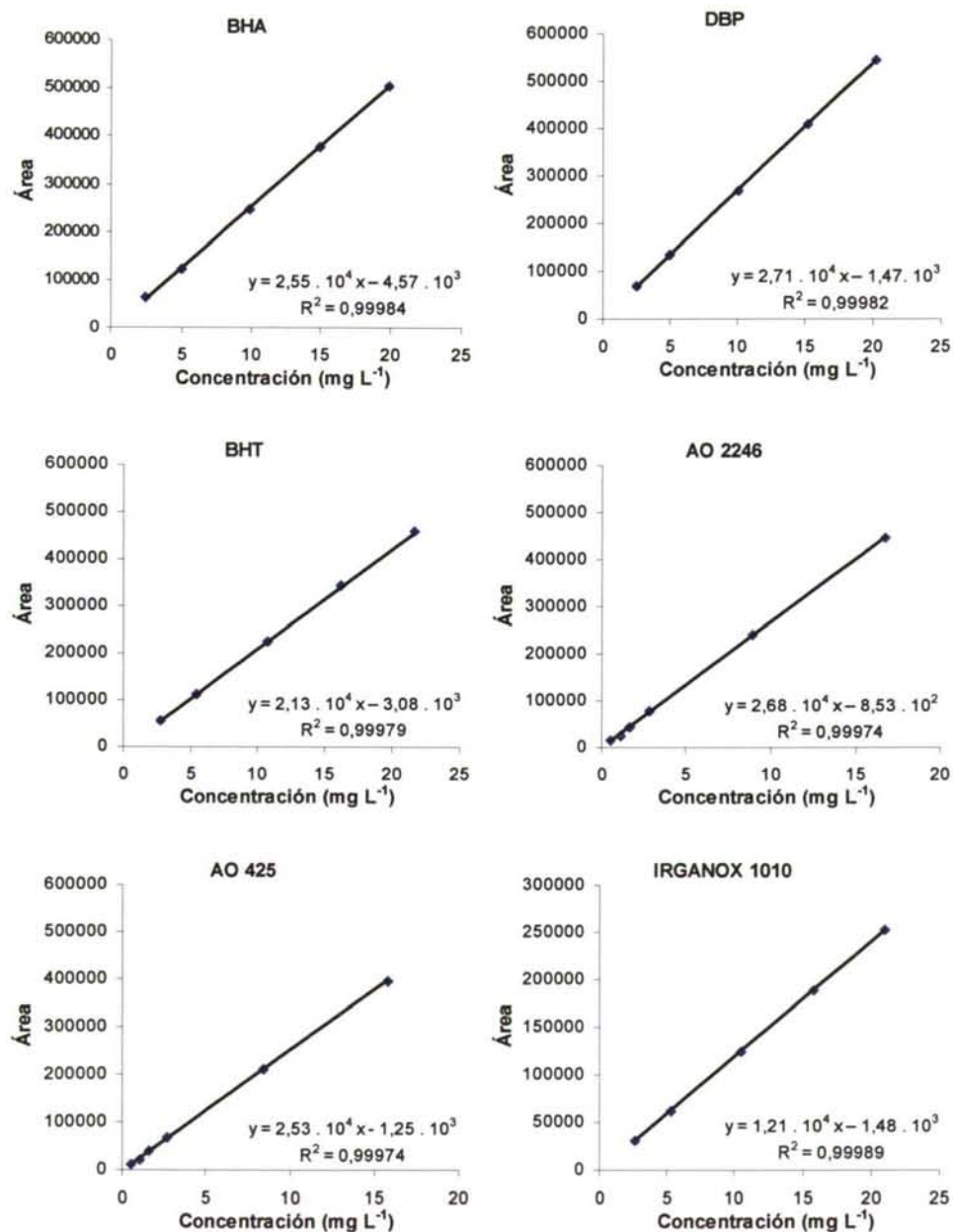


Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub>.



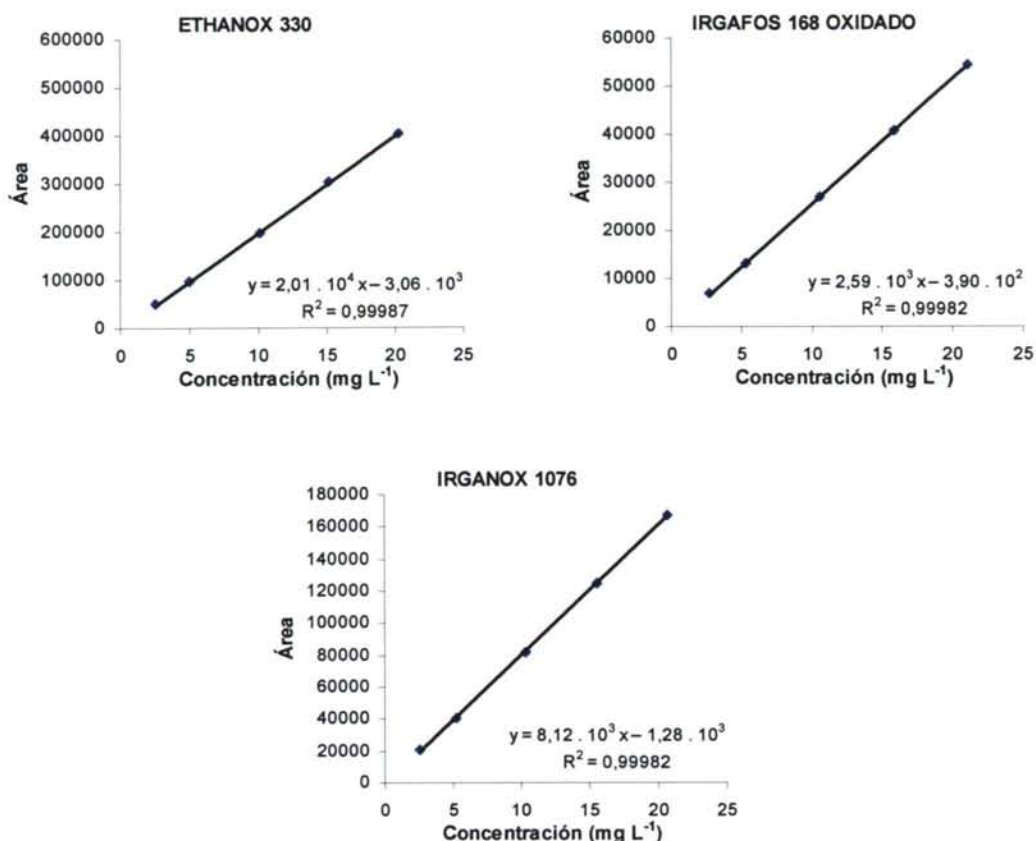


Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub> (continuación).

Los límites de cuantificación del método cromatográfico 0,92-1,29 mg L<sup>-1</sup> están por debajo de los LME establecidos por la legislación para cada compuesto, por lo que podría realizarse su determinación en los simulantes acuosos tras comprobar que la respuesta en la matriz acuosa no varía apreciablemente.

En el caso del AO 2246 y el AO 425 su LME de 1,5 mg L<sup>-1</sup> establecido para la suma de ambos compuestos dificultaría su determinación empleando únicamente el método cromatográfico desarrollado que tiene

como LC 1,16 mg L<sup>-1</sup> para el AO 2246 y 1,08 mg L<sup>-1</sup> para el AO 425 por lo que sería recomendable llevar a cabo una etapa de preconcentración previa.

### **3 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ANTIOXIDANTES EN EL SIMULANTE D**

#### **3.1 Preparación de disoluciones patrón**

Se prepararon disoluciones patrón individuales de todos los antioxidantes en THF (5000 mg L<sup>-1</sup>) y a partir de estas se preparó una disolución madre intermedia (500 mg L<sup>-1</sup>) mezcla de los 8 antioxidantes en THF.

Las disoluciones patrón de trabajo de los antioxidantes en aceite de oliva, se prepararon sobrecargando una cantidad conocida (medida en gramos) de aceite de oliva con la disolución madre mezcla de los antioxidantes en THF, para evitar de este modo los errores que se cometerían al medir un volumen de aceite.

De forma previa al análisis cromatográfico se introdujo una etapa de dilución del aceite de oliva que resulta ampliamente utilizada en la bibliografía [Demertzis y Franz, 1998; O'Brien y col., 1997; O'Brien y Cooper, 2001 y 2002; Cooper y col., 1998 y Riquet y col., 2002], de modo que las disoluciones patrón preparadas en aceite de oliva se diluyeron con THF en la relación  $2 \pm 0,01$  g de muestra de aceite hasta 5 mL de volumen final.

### 3.2 Descripción del método

Debido a la complejidad de la matriz aceite de oliva, que tiene un gran número de sustancias que interfieren en la respuesta cromatográfica de los antioxidantes se decidió estudiar la modificación del método cromatográfico utilizado para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos, con el fin de separar en lo posible los picos correspondientes al aceite y a los antioxidantes. En la puesta a punto de este nuevo método se incorporó acetonitrilo a la fase móvil y se modificó el gradiente hasta alcanzar las condiciones finales mostradas en la tabla IX.

Tabla IX. Condiciones de elución del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en aceite de oliva.

Condiciones de elución de la fase móvil					
Tiempo (minutos)	Metanol (%)	Acetonitrilo (%)	THF (%)	Agua (%)	Curva
0	10	10	0	80	lineal
5	35	35	0	30	lineal
10	100	0	0	0	lineal
20	100	0	0	0	lineal
22	0	0	100	0	lineal
30	0	0	100	0	lineal
32	50	50	0	0	lineal
34	10	10	0	80	convexa
39	10	10	0	80	lineal
Columna			Symmetry C <sub>18</sub> 3,0 x 150 mm 3,5 µm		
Flujo			0,5 mL min <sup>-1</sup>		
Temperatura del horno de columna			30 °C		
Volumen inyección			20 µL		
Intervalo de λ medido			200-400 nm		
Longitud de onda cuantificación			220 nm		

En las primeras etapas de la elución la fase móvil acetonitrilo:metanol:agua proporciona la polaridad adecuada que permite

retrasar la elución de los primeros picos del cromatograma aumentando la separación entre ellos, con el objeto de evitar en lo posible la coelución con picos presentes en el cromatograma de un blanco de aceite de oliva. También fue necesario introducir una etapa final de limpieza de la columna analítica con tetrahidrofurano (THF) para eliminar los restos de aceite de oliva después de cada inyección.

La figura 4 muestra un cromatograma completo, incluida la fase de limpieza de la columna cromatográfica, correspondiente a una disolución de antioxidantes en aceite de oliva de concentración  $5 \text{ mg Kg}^{-1}$ , diluida de acuerdo con la relación 2 g de muestra hasta 5 mL de THF y analizada según las condiciones de la tabla IX. En torno a 24 minutos se puede apreciar la elevada respuesta coincidiendo con la etapa de limpieza, debida al aceite retenido en la columna que se consigue eliminar.

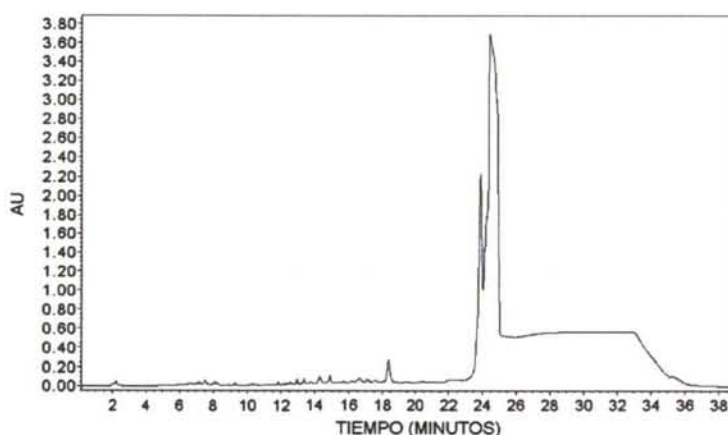


Figura 4. Cromatograma obtenido para una disolución  $5 \text{ mg Kg}^{-1}$  de antioxidantes en aceite de oliva que incluye la etapa final de limpieza (220 nm).

En la figura 5 se muestra el intervalo entre 0 y 20 minutos del mismo cromatograma, correspondiente a los tiempos de elución de los antioxidantes que aparecen acompañados de un gran número de picos de la matriz, aceite de oliva, como se observa en la figura 6, cromatograma de



un blanco de aceite de oliva diluido en THF en la misma proporción que la disolución patrón de antioxidantes.

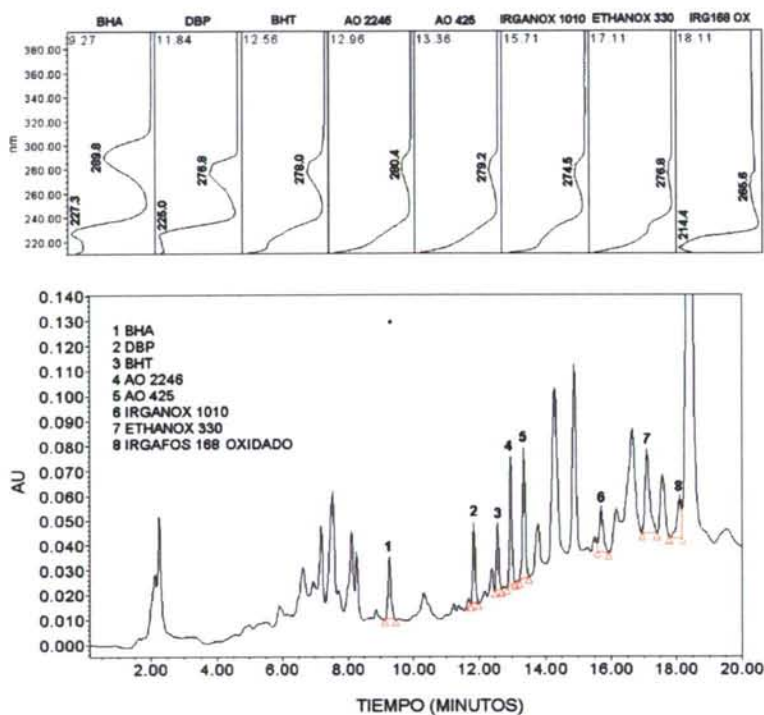


Figura 5. Cromatograma obtenido para una disolución  $5 \text{ mg Kg}^{-1}$  de antioxidantes en aceite de oliva después de diluir 2 g de disolución hasta 5 mL de THF (220 nm).

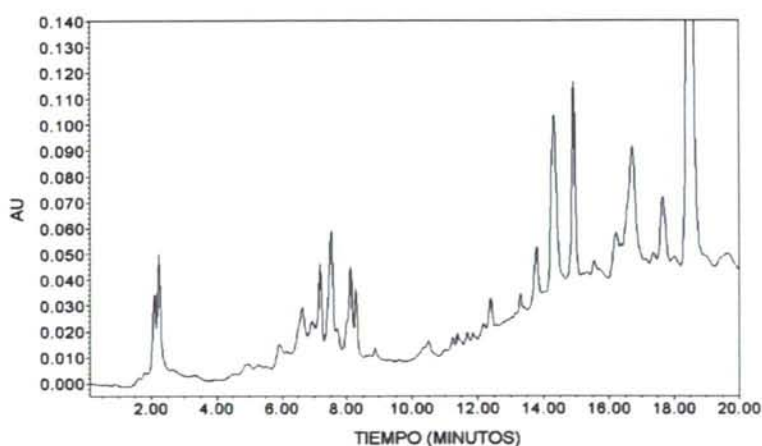


Figura 6. Cromatograma obtenido para un blanco de aceite de oliva a 220 nm (2 g de aceite de oliva hasta 5 mL de THF).

La identificación de cada compuesto se realizó al igual que para el método anterior a partir del tiempo de retención y espectro UV de cada analito. Debido a la alta señal de fondo causada por la matriz, aceite de oliva, en este caso se seleccionó como longitud de onda 220 nm, a la cual la respuesta de los antioxidantes es mayor. Antes de la cuantificación la respuesta cromatográfica de los antioxidantes se corrigió restando al cromatograma de la muestra la señal del blanco, para evitar la influencia en el resultado de la coelución de algún componente de la matriz con los picos de antioxidantes que en las condiciones de análisis no se separaron.

La tabla X muestra los parámetros cromatográficos obtenidos del nuevo método desarrollado.

*Tabla X. Valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para el método HPLC-UV de determinación de antioxidantes en aceite de oliva.*

	$t_R'$	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N
BHA	7,04	3,15			12366
DBP	9,61	4,31	1,37	9,08	41197
BHT	10,3	4,63	1,08	3,22	53810
AO 2246	10,7	4,81	1,04	1,75	49359
AO 425	11,1	4,99	1,04	1,54	35559
Irganox 1010	13,5	6,04	1,21	7,43	32238
Ethanox 330	14,9	6,67	1,10	3,50	23134
Irgafos 168 ox	15,9	7,11	1,07	2,33	32773

Al aumentar los tiempos de análisis de cada compuesto para evitar la interferencia de la matriz aceite de oliva se han incrementado también los valores de  $k'$  y  $R_s$  obtenidos, respecto al método cromatográfico anterior. De todas formas, los valores de  $k'$  se encuentran en el intervalo entre 3 y 5 para todos los antioxidantes excepto para los tres últimos compuestos eluidos, Irganox 1010, Ethanox 330 e Irgafos 168 oxidado, para los que resultan ligeramente superiores. Los valores de  $\alpha$  muestran que los

compuestos que se separan con mayor facilidad son DBP e Irganox 1010, al igual que en el método anterior.

En general, los parámetros cromatográficos indican que los cambios introducidos en la elución permiten mantener una buena resolución de los picos cromatográficos con alta eficacia de la columna y aunque ha aumentado el tiempo de análisis no se ha producido un ensanchamiento de los picos.

### 3.3 Precisión del método cromatográfico

Para evaluar la precisión del método cromatográfico se llevó a cabo el estudio de repetibilidad (tabla XI) utilizando una disolución patrón de 5 mg Kg<sup>-1</sup> y el de reproducibilidad (tabla XII) para una disolución patrón de 2,5 mg Kg<sup>-1</sup> de antioxidantes en aceite de oliva, para el tiempo de retención y el área del pico cromatográfico.

Tabla XI. Repetibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en aceite de oliva.

n= 6	Áreas				t <sub>R</sub>			
	A media	S <sub>r</sub>	CV	r	t <sub>R</sub> medio	S <sub>r</sub>	CV	r
BHA	152747	1,1.10 <sup>3</sup>	0,72	3,1.10 <sup>3</sup>	9,22	1,8.10 <sup>-2</sup>	0,20	5,0.10 <sup>-2</sup>
DBP	160854	2,6.10 <sup>3</sup>	1,6	7,4.10 <sup>3</sup>	11,8	1,5.10 <sup>-2</sup>	0,13	4,3.10 <sup>-2</sup>
BHT	148744	2,8.10 <sup>3</sup>	1,9	8,0.10 <sup>3</sup>	12,5	1,5.10 <sup>-2</sup>	0,12	4,1.10 <sup>-2</sup>
AO2246	262810	3,1.10 <sup>3</sup>	1,2	8,8.10 <sup>3</sup>	12,9	1,5.10 <sup>-2</sup>	0,12	4,2.10 <sup>-2</sup>
AO 425	253933	4,9.10 <sup>3</sup>	1,9	1,4.10 <sup>4</sup>	13,3	1,5.10 <sup>-2</sup>	0,12	4,3.10 <sup>-2</sup>
Irganox 1010	109198	3,9.10 <sup>3</sup>	3,6	1,1.10 <sup>4</sup>	15,6	2,3.10 <sup>-2</sup>	0,15	6,5.10 <sup>-2</sup>
Ethanox 330	312539	5,2.10 <sup>3</sup>	1,6	1,4.10 <sup>4</sup>	17,0	2,6.10 <sup>-2</sup>	0,15	7,3.10 <sup>-2</sup>
Irgafos 168 ox	158351	1,3.10 <sup>4</sup>	8,1	3,6.10 <sup>4</sup>	18,0	2,8.10 <sup>-2</sup>	0,16	8,0.10 <sup>-2</sup>

r = límite de repetibilidad = 2,8 x S<sub>r</sub> [UNE 82009: 1999]

Ambas disoluciones se diluyeron de acuerdo con la relación  $2 \pm 0,01$  g aceite hasta 5 mL de THF antes de ser inyectadas. Los resultados obtenidos mostraron una variabilidad inferior al 8,1 % en área y al 0,3% en  $t_R$  para todos los antioxidantes en las inyecciones realizadas durante un mismo día y menores al 13 % en área y al 0,6% en  $t_R$  para días diferentes, valores de precisión que se consideraron aceptables teniendo en cuenta la alta señal de fondo relativa al aceite de oliva.

Tabla XII. Reproducibilidad del método HPLC-UV para la determinación de antioxidantes en aceite de oliva.

n = 6	Área				$t_R$			
	A media	$S_R$	CV	R	$t_R$ medio	$S_R$	CV	R
BHA	66146	$2,3 \cdot 10^3$	3,4	$6,3 \cdot 10^3$	9,28	$4,8 \cdot 10^{-2}$	0,52	$1,3 \cdot 10^{-1}$
DBP	77394	$5,3 \cdot 10^3$	6,8	$1,5 \cdot 10^4$	11,8	$2,7 \cdot 10^{-2}$	0,23	$7,7 \cdot 10^{-2}$
BHT	90217	$9,8 \cdot 10^3$	11	$2,8 \cdot 10^4$	12,6	$3,4 \cdot 10^{-2}$	0,27	$9,6 \cdot 10^{-2}$
AO2246	117390	$1,5 \cdot 10^3$	1,3	$4,3 \cdot 10^3$	13,0	$4,4 \cdot 10^{-2}$	0,34	$1,2 \cdot 10^{-1}$
AO 425	115105	$2,8 \cdot 10^3$	2,4	$7,7 \cdot 10^3$	13,4	$4,4 \cdot 10^{-2}$	0,33	$1,2 \cdot 10^{-1}$
Irganox 1010	51885	$4,2 \cdot 10^3$	8,1	$1,2 \cdot 10^4$	15,7	$7,3 \cdot 10^{-2}$	0,46	$2,0 \cdot 10^{-1}$
Ethanox 330	122682	$8,3 \cdot 10^3$	6,7	$2,3 \cdot 10^4$	17,1	$9,3 \cdot 10^{-2}$	0,54	$2,6 \cdot 10^{-1}$
Irgafos 168 ox	47169	$6,1 \cdot 10^3$	13	$1,7 \cdot 10^3$	18,1	$1,1 \cdot 10^{-1}$	0,58	$3,0 \cdot 10^{-1}$

R = límite de reproducibilidad =  $2,8 \times S_R$  [UNE 82009: 1999]

### 3.4 Linealidad, límites de detección y cuantificación

Para obtener la rectas de calibrado de cada antioxidante se inyectaron 6 disoluciones en aceite de oliva en el intervalo desde 1 a  $20 \text{ mg Kg}^{-1}$  después de diluirlas de acuerdo con la relación  $2 \pm 0,01$  g hasta 5 mL de THF. Las rectas de calibrado obtenidas, junto con los límites de detección y cuantificación del método analítico se muestran en la figura 7 y la tabla XIII.



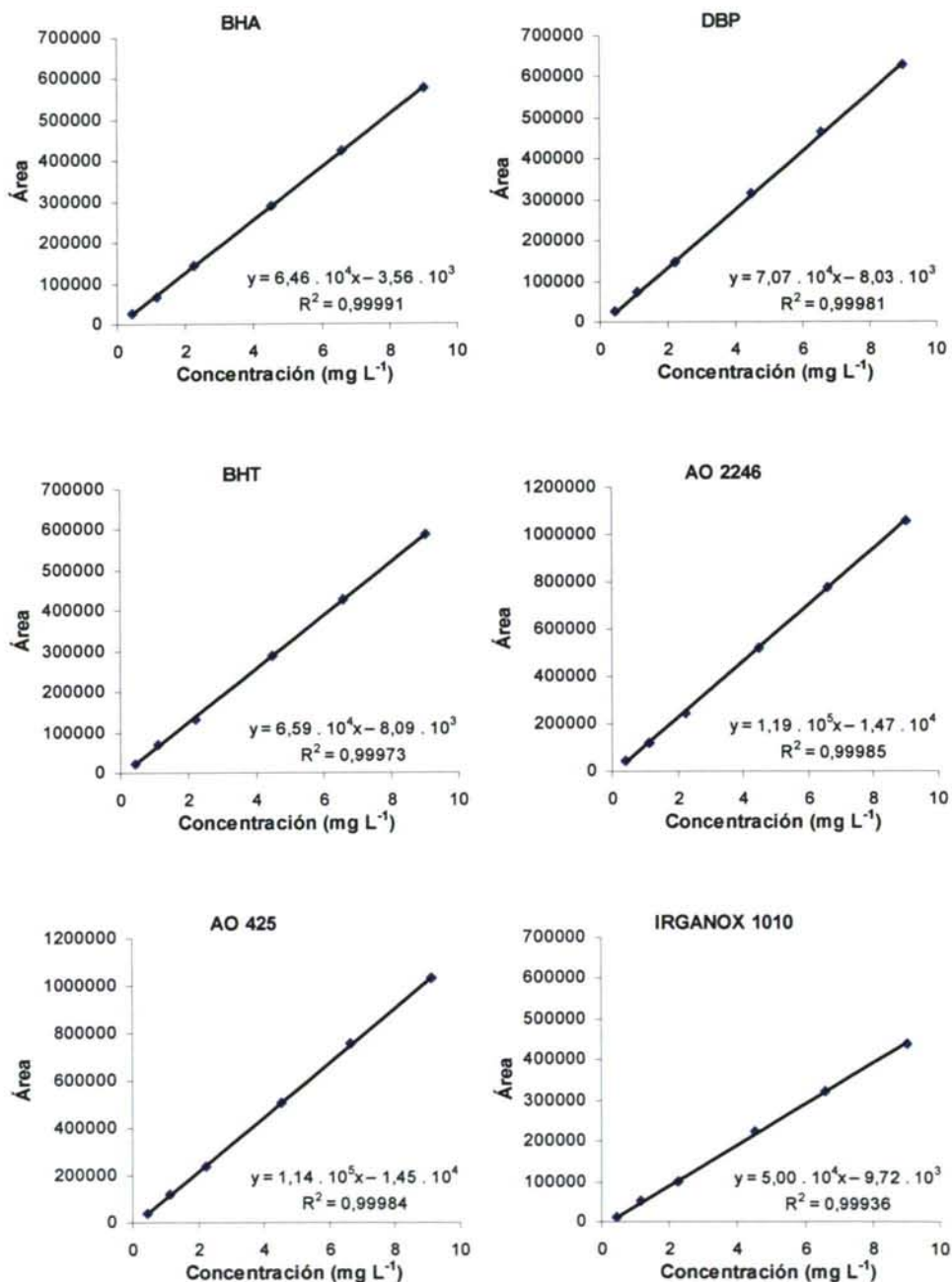


Figura 7. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes en aceite de oliva.

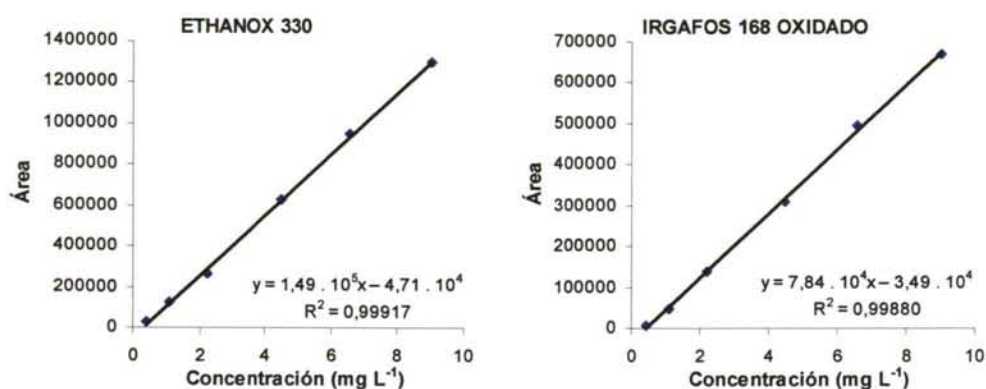


Figura 7. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes en aceite de oliva (continuación).

Tabla XIII. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes en aceite de oliva.

	Ecuación: $y = Ax + B$	R	$R^2$	RSD	$S_{y/x}$	$x_{LD}$ (mg Kg <sup>-1</sup> )	$x_{LC}$ (mg Kg <sup>-1</sup> )
BHA	$y = 6,46 \cdot 10^4 x - 3,56 \cdot 10^3$	0,99995	0,99991	85	2308	0,27	0,89
DBP	$y = 7,07 \cdot 10^4 x - 8,03 \cdot 10^3$	0,99991	0,99981	87	3623	0,38	1,28
BHT	$y = 6,59 \cdot 10^4 x - 8,09 \cdot 10^3$	0,99986	0,99973	87	4094	0,47	1,55
AO2246	$y = 1,19 \cdot 10^5 x - 1,47 \cdot 10^4$	0,99993	0,99985	87	5450	0,34	1,15
AO 425	$y = 1,14 \cdot 10^5 x - 1,45 \cdot 10^4$	0,99992	0,99984	87	5470	0,36	1,20
Irganox 1010	$y = 5,00 \cdot 10^4 x - 9,72 \cdot 10^3$	0,99968	0,99936	89	4738	0,71	2,37
Ethanox 330	$y = 1,49 \cdot 10^5 x - 4,71 \cdot 10^4$	0,99958	0,99917	92	16167	0,81	2,71
Irgafos 168 ox	$y = 7,84 \cdot 10^4 x - 3,49 \cdot 10^4$	0,99940	0,99880	95	10191	0,98	3,25

$x_{LD}$  concentración correspondiente a  $y_{LD} = y_b + 3 S_b$

$x_{LC}$  concentración correspondiente a  $y_{LD} = y_b + 10 S_b$

donde  $y_b$  = área del blanco y  $S_b$  = desviación estándar del blanco. En este caso se ha considerado:

$y_b = B$  (ordenada en el origen de la recta de calibrado)

$S_b = S_{y/x}$  [Miller y Miller, 2002]

Como se puede ver en la tabla XIII se confirma la linealidad del método en el intervalo estudiado. El aumento de valor de los límites de detección y cuantificación para la determinación cromatográfica de antioxidantes en muestras de aceite respecto a su determinación en muestras acuosas indica la pérdida de sensibilidad del método al aumentar la complejidad de la matriz con los componentes que interfieren. A pesar de ello la sensibilidad del método se considera satisfactoria ya que los LD y LC, de acuerdo con los LME establecidos por la legislación para los compuestos estudiados, permiten la aplicación de la metodología desarrollada para medir la migración específica de estos antioxidantes en aceite de oliva. Únicamente el AO 2246 y AO 425 podrían presentar mayor dificultad.

#### **4 CONCLUSIONES**

Se han desarrollado dos métodos cromatográficos mediante HPLC-UV con red de diodos empleando elución con gradiente en fase inversa que permiten la determinación de los antioxidantes estudiados en fase acuosa y aceite de oliva, respectivamente, con una buena resolución en un tiempo de análisis corto.

Se observa que la elución de los analitos en función de su polaridad agrupa a los antioxidantes según su masa molecular de forma que primero eluye el grupo de compuestos de menor tamaño: BHA, DBP, BHT, AO 2246 y AO 425 mientras que los restantes eluyen posteriormente de forma más escalonada: Irganox 1010, Ethanox 330, Irgafos 168 e Irganox 1076.

Los parámetros de calidad estudiados, precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación han proporcionado resultados satisfactorios para ambos métodos.

El método desarrollado para el análisis de antioxidantes en aceite de oliva muestra una mayor variabilidad así como límites de detección y cuantificación más elevados, como era predecible debido a la complejidad de la matriz.

Los LD y LC de ambos métodos permiten determinar los antioxidantes estudiados a niveles inferiores a sus correspondientes límites de migración específica. Únicamente la evaluación de la migración de AO 2246 y AO 425 puede exigir una etapa de preconcentración previa.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen D.W.; Chench M.R.; Crowson, A.; Leathard, D.A. y Saklatvala, R. (1994) Characterisation of electron beam generated transformation products of Irganox 1010 by particle beam liquid chromatography-mass spectrometry with on-line diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 679, 285-297.

Arpino, P.J.; Dilettato, D.; Nguyen, K. y Bruchet, A. (1990) Investigation of antioxidants and UV stabilizers from plastics. Part I. Comparison of HPLC and SFC; Preliminary SFC/MS study. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 5-12.

Baylocq, D.; Majcherczyq, C. y Pellerin, F. (1985) Detection et dosage des antioxydants dans les matieres plastiques a base de polyolefines. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 43 (4), 329-335.

Baylocq, D.; Majcherczyk, C. y Pellerin, F. (1989) Analyse rapide des matieres plastiques a usage pharmaceutique. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 47 (4), 196-204.



Berg, B.E.; Hegna, D.R.; Orlie, N. y Greibrokk, T. (1992) Preliminary study of specific migration of polymer additives from polypropylene to an acid-based food simulant. Short communications. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 837-839.

Berg, B.E.; Hegna, D. R.; Orlie, N. y Greibrokk, T. (1993) Determination of low levels of polymer additives migrating from polypropylene to food simulated liquids by capillary SFC and solvent venting injection. *Chromatographia*, 37 (5/6), 271-276.

Bruheim, I.; Molander, P.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. y Ommundsen, E. (2000) Temperature-programmed packed capillary liquid chromatography coupled to Fourier-transform Infrared Spectroscopy. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23 (9), 525-560.

Castle, L.; Mercer, A.J. y Gilbert, J. (1995) Chemical migration from Polypropylene and Polyethylene aseptic food packaging as affected by hydrogen peroxide sterilization. *Journal of Food Protection*, 58 (2), 170-174.

Cooper, I.; Goodson, A. y O'Brien, A. (1998) Specific migration testing with alternative fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15 (1), 72-78.

Cortes, H.J.; Bell, B.M.; Pfeiffer, C.D. y Graham, J.D. (1989). Multidimensional chromatography using on-line coupled microcolumn size exclusion chromatography-capillary gas chromatography-mass spectrometry for determination of polymer additives. *Journal of Microcolumn Separations*, 1 (6), 278-289.

Dabrio, M.V., Blanch, G.P.; Cifuentes, A.; Díez-Masa, J.A.; De Frutos, M.; Herraiz, M.; Martínez Castro, I. y Sanz Perucha, J. (2000) Cromatografía y electroforesis en columna. *Springer-Verlag Ibérica*. Barcelona, España.

Demertzis, P.G., y Franz, R. (1998) Development of an HPLC method for measurements of the stability of Irganox-type polymer antioxidants in fatty food simulants. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*, 206, 193-198.

Di Pasquale, G y Galli, M. (1984) Determination of additives in polyolefins by capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 7, 484-486.

Di Pasquale, G.; Giambelli, L.; Soffientini, A. y Paiella, R. (1985) Determination of additives in polyolefins by capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 8, 618-622.

Dilettato, D. y Arpino, P.J. (1989) Analysis of polymer additives in plastics for food packaging: comparison of the performances of high performance chromatography and capillary supercritical fluid chromatography. *Agriculture, food chemistry and the consumer: Proceedings of the fifth European conference on Food Chemistry*, Vol 1, 73-77.

El Mansouri, H.; Yagoubi, N. y Ferrier, D. (1998) Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. *Chromatographia*, 48 (7/8), 491-496.

Garde, J.A.; Catalá, R. y Vergara, R. (1998) Analysis of antioxidants extracted from polypropylene by supercritical fluid extraction. *Food Additives and Contaminants*, 15 (6), 701-708.

Garde, J.A.; Catalá, R.; Gavara, R. y Hernandez, R.J. (2001) Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 18 (8), 750-762.

Goydan, R. y Schwoppe, A.D.; Reid, R.C. y Cramer, G. (1990) High-temperature migration of antioxidants from polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 7 (9), 323-337.

Hall III, C.A.; Zhu, A. y Zeece, M.G. (1994) Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography separation of food grade antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 919-921.

Haney, M.A y Dark, W.A. (1980) A reversed-phase high pressure liquid chromatographic method for analysis of additives in polyolefins. *Journal of Chromatographic Science*, 18, 655-659.

Helmroth, I.E.; Dekker, M. y Hankemeier, T. (2002) Influence of solvent absorption on the migration of Irganox 1076 from LDPE. *Food Additives and Contaminants*, 19 (2), 176-183.

Hirata, Y. y Okamoto, Y.J. (1989) Supercritical fluid extraction combined with Microcolumn Liquid Chromatography for the Analysis of Polymer additives. *Journal of Microcolumn Separations*, 1 (1), 46-51.

Louden, D.; Handley, A.; Lenz, E.; Sinclair, I.; Taylor, S. y Wilson, I.D. (2002) Reversed-phase HPLC of polymer additives with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, IR, H NMR and MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 508-515.

Macko, T.; Siegl, R. y Lederer, K. (1995) Determination of phenolic antioxidants in polyethylene with dissolution by n-heptane in a autoclave. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 221 (4021), 179-191.



Marcato, B y Vianello, M. (2000) Microwave-assisted extraction by gas sample preparation for the systematic analysis of additives in polyolefins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 869, 285-300.

Marcato, B.; Guerra, S.; Vianello, M. y Scalia, S. (2003) Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 217-225.

Marque, D.; Feigembaun, A.; Dainelli, D. y Riquett, A-M. (1998) Safety evaluation of an ionized multilayer plastic film used for vacuum cooking and meat preservation. *Food Additives and Contaminants*, 15 (7), 831-841.

Miller, J.N. y Miller, J.C. (2002) Estadística y quimiometría para química analítica. 4º edición, *Pearson educación*, Madrid. Cap. 5. Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación, p. 111-155.

Molander, P.; Haugland, K.; Hegna, D. R.; Ommundsen, E.; Lundanes, E. y Greibrokk, T. (1999) Determination of low levels of an antioxidant in polyolefins by large-volume injection temperature-programmed packed capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, 103-109.

Molander, P.; Holm, A.; Lundanes, E.; Hegna, D.R.; Ommundsen, E. y Greibrokk, T. (2002) Temperature-promoted large-volume solute enrichment in column-switching miniaturized liquid chromatography: determination of an antioxidant. *The Analyst*, 127, 892-897.

Moskovkin, A.S. (2002) Chromatographic-Mass-Spectrometric determination of toxic substances liberated from polymeric materials. *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (6), 507-512.



Munteanu, D.; Isfan, A.; Isfan, C. y Tincul, I. (1987) High-performance liquid chromatographic separation of polyolefin antioxidants and light-stabilisers. *Chromatographia*, 23 (1), 7-14.

Nielson, R.C. (1991) Extraction and quantitation of polyolefin additives. *Journal of Liquid Chromatography*, 14 (3), 503-519.

Nielson, R.C. (1993) Recent advances in polyolefin additives analysis. *Journal of Liquid Chromatography*, 16 (7), 1625-1638.

O'Brien, A.P., Cooper, I. y Tice, P.A. (1997) Correlation of specific migration (Cf) of plastic additives with their initial concentration in the polymer (Cp). *Food Additives and Contaminants*, 14, 705-719.

O'Brien, A. y Cooper, I. (2001) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for polypropylene. *Food Additives and Contaminants*, 18 (4), 343-355.

O'Brien, A. y Cooper, I. (2002) Practical experience in the use of mathematical models to predict migration of additives from food-contact polymers. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 63-72.

Pinto, A.M. y Taylor, L.T. (1998) Evolution of a method for quantitative supercritical fluid extraction of Ethanox 330 antioxidant from high-density polyethylene. *Journal of Chromatography A*, 811, 163-170.

Poole, C.F. (2003) The essence of chromatography. *Elsevier*, Ámsterdam, Laussane, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.

Quinto-Fernández, E.J.; Pérez-Lamela, C.; Simal-Gándara, J. (2003) Analytical methods for food-contact materials additives in olive oil simulant at sub-mg Kg<sup>-1</sup> level. *Food Additives and Contaminants*, 20 (7), 678-683.

Riquet, A.M; Scholler, D y Feigenbaum, A. (2002) Tailoring fatty food simulants made from solvents mixtures (2): determining the equivalent migration behaviour of olive oil and of solvents in the case of polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 582-593.

Salafranca, J; Cacho, J. y Nerín, C. (1999) Supercritical fluid extraction (SFE) optimization by full-factorial design for the determination of Irganox 1076, Irgafos 168 and Chimassorb 81 in virgin and recycled polyolefins. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22 (10), 553-558.

Schabron, J.F. y Feska, L.E. (1980) Determination of BHT, Irganox 1076, and Irganox 1010 antioxidant additives in polyethylene by high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 52, 1411-1415.

Schabron, J.F.; Smith, V.J. y Ware, J.L. (1982) Determination of UV absorbing polyolefin additives by gradient and isocratic normal-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 5 (4), 613-624.

Skoog, D.A. y Leary, J.J. (1994) Análisis instrumental. 4ª edición, McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid.

Spyropoulos, D.V. (1998) Stability testing of the plastics additives 2,4-dihydroxybenzophenone, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone, 2-hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone, 2-ethoxy-2-ethyloxanilide (tinuvin 312) and 2,2'-methylenbis(4-methyl-t-tert-butyl phenol) in aqueous and fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15 (3), 362-369.

Summanen, J.; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Sirén, H. y Riekkola, M.L. (1995) Determination of phenolic antioxidants by capillary electrophoresis with ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science*, 33, 704-710.

Thilén, M. y Shishoo, R.J. (2000) Optimization of experimental parameters for the quantification of polymer additives using SFE/HPLC. *Journal of Applied Polymer Science*, 76, 938-946.

UNE 82009: 1999. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Norma equivalente a la Norma Internacional ISO 5725:1994, AENOR 1999.

Vadakkoott, C.G.; Yoginder, N.S. e Ishwar S.B. (1983) Quantitative determination of antioxidants and ultraviolet stabilizers in polymers by high performance liquid chromatography. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 113 (1170), 219-225.

Yu, K.; Block, E. y Balogh, M. (2000) LC-MS analysis of polymer additives by electron and atmospheric-pressure ionization: identification and quantification. *LC-GC*, 18 (2), 172-178.

Zhou, L.Y.; Ashraf-Khorzssani, M. y Taylor, L.T. (1999) Comparison of methods for quantitative analysis of additives in low-density polyethylene using supercritical fluid and enhanced solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 858, 209-218.

**Capítulo V**  
***Tratamiento de la muestra en***  
***determinaciones de migración específica***



## Capítulo V. Tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>151</b>
1.1	Métodos de tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica de antioxidantes .....	151
1.2	Objetivo .....	155
1.3	Material y equipos.....	156
1.4	Reactivos .....	157
<b>2</b>	<b>Extracción líquido-líquido en simulante A .....</b>	<b>159</b>
2.1	Preparación de disoluciones patrón.....	159
2.2	Ensayos preliminares .....	160
2.3	Condiciones finales del método analítico LL-HPLC-UV .....	172
2.4	Precisión del método analítico, límites de detección y de cuantificación.....	173
2.5	Aplicación a muestras comerciales.....	173
<b>3</b>	<b>Extracción SPE en los simulantes acuosos A, B y C.....</b>	<b>175</b>
3.1	Preparación de disoluciones patrón.....	176
3.2	Ensayos preliminares mediante SPE.....	176
3.3	Puesta a punto de la etapa de SPE .....	184
3.4	Condiciones finales del método analítico SPE-HPLC-UV para la determinación de migración específica..	188

3.5	Precisión, límites de detección y de cuantificación para el método analítico SPE-HPLC-UV .....	189
3.6	Aplicación a muestras comerciales .....	191
4	<b>Determinación de migración específica de antioxidantes en simulante D.....</b>	<b>192</b>
4.1	Ensayos preliminares .....	193
4.2	Extracción LL de antioxidantes en aceite de oliva ...	194
5	<b>Conclusiones .....</b>	<b>200</b>
5.1	Migración específica en simulantes acuosos.....	200
5.2	Migración específica en aceite de oliva .....	202
6	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>202</b>

## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Métodos de tratamiento de la muestra en determinaciones de migración específica de antioxidantes**

Los niveles de migración específica de antioxidantes en alimentos generalmente se determinan, como se comentó anteriormente, utilizando los simulantes permitidos por la legislación para simplificar este tipo de análisis: simulante A (agua destilada), simulante B (ácido acético al 3%), simulante C (etanol al 10%) y simulante D (aceite de oliva, entre otros).

La determinación de niveles de migración específica de antioxidantes en simulantes precisa un pretratamiento de la muestra especialmente en los simulantes acuosos donde los niveles de migración esperados son muy bajos debido al carácter lipofílico de los aditivos. En los simulantes grasos, en los que los valores de migración son superiores, el pretratamiento es también necesario para reducir las interferencias asociadas a la complejidad de la matriz [O'Brien y Cooper, 2001].

En la actualidad no se conoce ningún método propuesto por la legislación española o europea para la determinación de los niveles de migración específica de los antioxidantes estudiados, por lo que se han consultado diferentes trabajos de investigación centrados en este tema.

A continuación se recoge la metodología analítica que proponen diferentes autores para el tratamiento de las muestras de simulantes de alimentos en las determinaciones de migración específica de estos antioxidantes, en dos grupos diferenciados correspondientes a simulantes acuosos y al simulante graso, aceite de oliva.

*Tratamiento de la muestra en la determinación de ME en simulantes acuosos*

- Análisis mediante HPLC sin pretratamiento de la muestra: O'Brien y col. (1997) estudiaron la migración específica de Irganox 1076 en ácido acético al 3% y etanol al 15% a partir de PEBD y poliestireno de alto impacto (HIPS) mediante la inyección directa del simulante en HPLC.
- Análisis mediante HPLC con dilución previa de la muestra: Spyropoulos (1998) determinó AO 2246 en etanol al 15% y ácido acético al 3% tras realizar una dilución con THF en una proporción 1:1 previa a su análisis cromatográfico, permitiendo cuantificar niveles de concentración que duplican el LME.
- Evaporación del simulante y redisolución previa a la determinación cromatográfica: Garde y col. (1998) estudiaron la migración de los antioxidantes Irgafos 168 e Irganox 1076 a partir de polipropileno en simulantes acuosos. Después de realizar el ensayo de migración global, el residuo del simulante acuoso una vez evaporado, se redissuelve en cloroformo y se analiza mediante CG para determinar el nivel de migración específica. Estos métodos son aplicables a la determinación de aditivos muy poco volátiles que no se pierden durante el proceso de evaporación [Baner y col., 1994].
- Extracción LL previa a la determinación cromatográfica: Moskovkin (2002) desarrolló un método para la determinación de BHT y AO 2246 en simulante acuoso por CG con un tratamiento previo mediante una etapa de extracción LL de simulante con 3 porciones de diclorometano a pH menor que 2 que aplicó a su estudio de migración a partir de diferentes matrices poliméricas, entre las que se encuentran poliestireno y policloruro de vinilo. Berg y col. (1992, 1993) desarrollaron un estudio de migración específica de aditivos poliméricos a partir de PP en el simulante ácido acético. Los



antioxidantes Irganox 1010 e Irgafos 168 se sometieron a extracción LL con cloroformo, concentración bajo corriente de nitrógeno y análisis mediante fluidos supercríticos (SFC). Simoneau y Hannaert (1999) determinaron Irganox 1076 en etanol al 15% y ácido acético al 3% mediante CG tras una etapa de extracción LL con hexano en una proporción 1:1 respecto al volumen de simulante, añadiendo un 10% de agua destilada para provocar la separación instantánea de ambas fases.

- Microextracción en fase sólida (SPME) seguida de CG: Tombesi y Freije (2002) determinaron la migración de BHT en agua mineral embotellada mediante SPME con fibras de polidimetilsiloxano alcanzando un límite de cuantificación muy bajo, de  $13,9 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### *Tratamiento de la muestra en la determinación de ME en aceite de oliva*

- Extracción líquido líquido: Moskovkin (2002) determinaron BHT y AO 2246 en aceite mediante extracción LL con etanol y posterior separación y cuantificación mediante CG, para lo que la muestra de aceite se extrae con dos fracciones de etanol, en relación aceite:etanol 1:10, método que aplicaron para estudiar la migración a partir de diferentes matrices poliméricas, entre las que se encuentran poliestireno y policloruro de vinilo. Simoneau y Hannaert (1999) evaluaron los niveles de migración del Irganox 1076 al aceite de oliva mediante extracción con acetonitrilo en una proporción 1:1 respecto al volumen de simulante y posterior análisis por CG.
- Dilución del aceite previa a la determinación mediante HPLC: la dilución de la muestra de aceite se ha llevado a cabo con diferentes disolventes como THF en una proporción del 40% para determinar distintos tipos de Irganox [Demertzis y Franz, 1998] o acetona, en proporción 2 g aceite/10 mL acetona para el análisis de Irganox 1076 [O'Brien y col., 1997; Cooper y col., 1998; O'Brien y Cooper, 2001 y

2002] o mezclando 100  $\mu\text{L}$  de aceite con 100  $\mu\text{L}$  de acetona para determinar Irgafos 168 tanto oxidado como no oxidado [Riquet y col., 2002]

- Determinación por diferencia de concentración en el material polimérico: con esta técnica se cuantifica la concentración del aditivo en el material polimérico antes y después del contacto con el simulante. Marcato y col. (2003) aplicaron este procedimiento para la determinación de la migración de Irganox 1010 e Irgafos 168 a partir de materiales poliméricos usados como envases farmacéuticos en mezclas grasas, tras cuantificar mediante extracción con energía de microondas su concentración en el envase antes y después de la migración.

Algunos de los antioxidantes estudiados, BHA y BHT se pueden utilizar como aditivos de alimentos generalmente hasta niveles en torno a 200  $\text{mg L}^{-1}$  [Directiva 95/2/CE] por lo que ante las dificultades que presenta su extracción en el aceite de oliva se ha considerado de interés consultar la metodología analítica para su determinación en alimentos grasos.

#### *Determinación de antioxidantes en alimentos grasos*

- González y col.(1999) determinaron los antioxidantes sintéticos BHA y BHT en alimentos grasos, entre los que se encuentra el aceite, mediante extracción LL utilizando posteriormente la SPE para limpiar el extracto. Se mezcla una cantidad de 0,75-2,5 g de muestra grasa con 2 mL de hexano saturado en acetonitrilo y se extrae la muestra con 10 mL de acetonitrilo saturado en hexano. Después de la etapa de extracción se eliminan los restos de aceite del acetonitrilo, se deja una hora en el congelador (se elimina el 95%), y se pasa a través de relleno XAD-2 que retiene los analitos y un porcentaje de aceite.
- Karovicová y Simko (2000) efectuaron una revisión bibliográfica para el análisis de antioxidantes sintéticos fenólicos en alimentos mediante

HPLC entre los que se encuentran el BHA, el BHT y el Ethanox 330. La determinación de estos antioxidantes en alimentos grasos generalmente tiene lugar por dilución previa a su análisis o por extracción con algún disolvente principalmente acetonitrilo o una combinación de alcohol:agua, aunque el uso de acetonitrilo proporciona unas recuperaciones bastante bajas para el BHT y alta extracción de sustancias interferentes.

- Método oficial AOAC [AOAC Official Method 983.15] para la determinación de los antioxidantes fenólicos BHA y BHT en aceites en el que 5,5 g de aceite previamente mezclado con 20 mL hexano saturado de ACN se extraen con 3 fracciones de 50 mL de ACN saturado en hexano. Boyce y Spickett (1999) aplican este método a muestras de aceite de sésamo.

## 1.2 Objetivo

Este trabajo tiene como objetivo la determinación de los niveles de migración específica de los antioxidantes estudiados en los simulantes acuosos establecidos por la legislación, agua destilada, ácido acético al 3% (p/v) y etanol al 10% (v/v) y el simulante graso aceite de oliva, para lo que se considera necesario poner a punto una etapa de extracción y purificación de antioxidantes de los simulantes de alimentos previa a la determinación mediante HPLC- UV con red de diodos.

En el capítulo anterior se desarrollaron dos métodos cromatográficos para la determinación de los antioxidantes estudiados, que permiten determinar si estos compuestos cumplen los límites de migración específica exigidos por la legislación, aunque en el caso del AO 2246 y AO 425 obligaría a trabajar en torno al límite de cuantificación del método. Sin embargo, se ha considerado de interés el desarrollo de una metodología analítica que aporte una mayor sensibilidad para caracterizar el perfil de



migración que experimentan las poliolefinas en los diferentes simulantes, teniendo en cuenta además que la legislación es susceptible de posibles reformas.

Por lo tanto en este capítulo se ha estudiado el desarrollo de métodos de preconcentración de los antioxidantes que nos permitan disminuir su límite de cuantificación en los dos tipos de simulantes, acuoso y aceite de oliva:

- Simulante acuoso: se comprobó que la evaporación del simulante acuoso y posterior redisolución, no resultaba factible realizando unos primeros ensayos para simulante A sobrecargado con BHA, DBP, BHT, Irganox 1010, Irgafos 168 oxidado e Irganox 1076 en los que se obtuvieron recuperaciones de tan sólo el 6-35 %, por lo que se ha estudiado la utilización de dos técnicas de extracción, líquido-líquido (LL) y extracción en fase sólida (SPE).
- Simulante aceite de oliva: se ha estudiado la aplicación de la extracción LL, SPE y dilución de la muestra.

Tras la etapa de preconcentración, la determinación de los compuestos se llevó a cabo mediante HPLC-UV con red de diodos con los métodos desarrollados en el capítulo anterior.

### 1.3 Material y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters (Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.
  - Sistema de mezcla a baja presión.
  - Sistema de desgasificación al vacío en línea de cuatro canales.



- Inyector automático.
- Detector UV con red de diodos Waters (Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Sistema de recogida y procesamiento de datos Millennium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,9 x 150 mm empacada con relleno Nova Pack C<sub>18</sub> 60 Å, 4 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,0 x 150 mm empacada con relleno Symmetry C<sub>18</sub>, 3,5 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).
- Sistema de vacío Büchi (Flawil, Suiza) V-500 equipado con controlador de presión Büchi B-721.
- Cartuchos de sílice C<sub>18</sub> Sep-Pack Plus 360 mg (Waters, Mildford, MA, USA).
- Cartuchos DIOL Sep-Pack Plus 360 mg (Waters, Mildford, MA, USA).
- Centrífuga modelo Angular 6 (P Selecta, Barcelona, España).

#### 1.4 Reactivos

- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- THF para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Metanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- n-hexano para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido acético glacial para HPLC (Panreac Química, Barcelona, España).
- Ácido nítrico (60%) para análisis (Panreac Química, Barcelona, España).

- Hidróxido sódico (98%) para análisis (Panreac Química, Barcelona, España).
- Sulfato sódico anhidro ( $\geq 99\%$ ) (Fluka, Buchs, Suiza).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford MA, USA).
- Aceite de oliva Carbonell con una acidez máxima de 0,4°.
- Antioxidantes:
  - 2,2'-metilenbis(4-metil-6-terc-butifenol) (AO 2246) CAS N° [119-47-1]; 2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butilfenol) (AO 425) CAS N° [88-24-4]; BHA, mezcla de isómeros 2[3]-t-butil-4-hidroxianisol; 2[3]-t-butilhidroquinona monometil éter, mínimo 90% isómero-3 / 9% isómero-2-) CAS N° [25013-16-5]; 2, 6 di-terc-butil-p-cresol (BHT, 99%) CAS N° [128-37-0] y 1,3,5-trimetil-2,4,6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno (Ethanox 330, 99%) CAS N° [1709-70-2] de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
  - 2,4-di-terc-butil-fenol (DBP,  $\geq 98\%$ ) CAS N° [96-76-4] de Fluka (Buchs, Suiza).
  - Fosfito de tris(2, 4-di-terc-butilfenilo) (Irgafos 168) CAS N° [31570-04-4]; tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol (Irganox 1010) CAS [6683-19-8]; 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-propionato de octadecilo (Irganox 1076) CAS [2082-79-3] de Ciba (Basel, Suiza).

## **2 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN SIMULANTE A**

En este apartado se estudia la aplicación de la técnica de extracción líquido-líquido como etapa de preconcentración de antioxidantes en el simulante A (agua destilada) para varios antioxidantes fenólicos, BHA, BHT, Ethanox 330, Irganox 1010 e Irganox 1076, un antioxidante fosfito Irgafos 168 y su producto de degradación DBP.

Se elige el hexano como disolvente para la extracción, que ha sido utilizado por Simoneau y Hannaert (1999) para la determinación de Irganox 1076 en simulantes acuosos, permite una buena separación entre las fases y presenta una alta volatilidad que favorece su posterior evaporación. El extracto se evapora en rotavapor y tras la redisolución del residuo con un volumen de disolvente conocido se analiza mediante HPLC-UV con el método descrito en el capítulo IV para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos. Para la optimización de esta etapa se recurre a un diseño de experimentos Plackett-Burman que selecciona las variables que afectan de forma significativa a la extracción de los antioxidantes a partir de la matriz acuosa y al estudio compuesto central que fija los valores más adecuados de las variables seleccionadas. Previamente se ha observado el efecto del pH sobre la extracción de los antioxidantes y se ha estudiado la etapa de redisolución tras la evaporación debido a la pobre solubilidad de los antioxidantes en algunos disolventes.

### **2.1 Preparación de disoluciones patrón**

Se emplearon disoluciones patrón madre individuales ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de los 7 antioxidantes estudiados de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo IV, a partir de las cuales se prepararon disoluciones patrón de trabajo, mezcla de todos los compuestos, por dilución con acetonitrilo. En la etapa de extracción líquido-líquido de antioxidantes se utilizaron

muestras acuosas de 100 mL sobrecargadas con la disolución patrón mezcla de todos los antioxidantes hasta una concentración de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 2.2 Ensayos preliminares

Para llevar a cabo la determinación de antioxidantes en muestras de agua mediante extracción líquido líquido se establecieron inicialmente las condiciones de análisis generales que a continuación se indican: la muestra acuosa de 100 mL se sometió a tres extracciones consecutivas con diferentes fracciones de hexano en un embudo de decantación de 250 mL. Los extractos de hexano se secaron con sulfato sódico después de cada extracción y se recogieron juntos en un matraz en forma de corazón, que se lleva al rotavapor para su evaporación. Este residuo se redisuelve y analiza mediante HPLC-UV con red de diodos en fase inversa mediante el método cromatográfico descrito en el capítulo IV para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos.

Antes de poner a punto esta etapa de extracción LL mediante diseño de experimentos se realizan ensayos previos relativos a:

- La etapa de evaporación y redisolución del residuo. Se consideró de interés obtener algunos valores experimentales acerca del comportamiento de los antioxidantes en estas etapas debido al carácter volátil de algunos antioxidantes y a su pobre solubilidad en algunos disolventes.
- La influencia del pH de la muestra en la extracción LL de gran importancia en la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices acuosas.

### *Etapa de evaporación y redisolución del residuo*

Las condiciones de evaporación del hexano en rotavapor se fijaron en 200 mbar y  $30^\circ\text{C}$ , hasta la última gota, ya que se comprobó que la



evaporación hasta sequedad aumentaba en gran medida la pérdida de antioxidantes.

Se comparó la eficacia de acetonitrilo y THF para recuperar los antioxidantes estudiados por ser los disolventes en los que se solubiliza un mayor número de los antioxidantes estudiados.

Se sobrecargaron 20 mL de hexano con todos los antioxidantes hasta  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , se evaporaron en rotavapor y se redisolviéron en 1 mL de THF o acetonitrilo, realizando 5 réplicas para cada uno de ellos.

Los datos de recuperación obtenidos (tabla I) resultan similares para ambos disolventes, estando comprendidos en el rango 82-91%, lo que confirma la validez de la evaporación en rotavapor para llevar a cabo la preconcentración de antioxidantes sin pérdidas importantes.

*Tabla I. Efecto del disolvente en la re-disolución del residuo tras la evaporación en la extracción LL.*

n = 5	Redisolución en THF			Redisolución en acetonitrilo		
	Recuperación (%)	S	CV	Recuperación (%)	S	CV
BHA	85	4,5	5,3	86	6,4	7,5
DBP	85	5,6	6,6	86	7,5	8,7
BHT	76	9,6	13	82	7,4	9,1
Irganox 1010	83	5,3	6,4	88	7,2	8,2
Ethinox 330	83	4,3	5,2	86	6,2	7,1
Irgafos 168 ox	88	8,8	10	86	8,8	10
Irganox 1076	91	11	12	86	6,1	7,0

La variabilidad de los resultados obtenidos es menor con el uso de acetonitrilo que con THF a pesar de la baja solubilidad de los antioxidantes Ethinox 330, Irgafos 168 e Irganox 1010 en este primer disolvente. Esto podría explicarse porque la evaporación se está realizando hasta la última gota, no hasta sequedad, con lo que el disolvente en realidad estaría diluyendo esta gota y no solubilizando los antioxidantes.

Como se puede ver en la tabla I, el mayor CV que se obtiene con acetonitrilo es del 10%, correspondiente a la recuperación del Irgafos 168, mientras que con THF se obtienen CV un poco mayores, 12% para el Irganox 1076 y 13% para el BHT, por lo que el acetonitrilo es el disolvente que se emplea en lo sucesivo en la redisolución del extracto evaporado.

#### *Influencia del pH en la extracción de antioxidantes mediante LL*

La extracción de compuestos fenólicos a partir de muestras acuosas se ve facilitada generalmente por la acidificación de la muestra, que evita la desprotonación de los fenoles permitiendo obtener mejores recuperaciones, como indican diferentes trabajos llevados a cabo mediante extracción en fase sólida (SPE) con diversos tipos de rellenos [Dupeyron y col., 1995; Zhi y col., 1996; Heberer y Stan, 1997; Masqué y col., 1998; Patsias y Papadopoulou-Mourkidou, 2000; Wissiack y col., 2000].

Teniendo en cuenta que los antioxidantes estudiados, a excepción del Irgafos 168, son compuestos fenólicos, se estudió la influencia del pH de la muestra en la extracción LL de estos compuestos a partir del simulante A (agua destilada), realizando varios ensayos con muestras acidificadas en un rango de pH comprendido entre 2 y 6,4, este último corresponde a la muestra sin acidificar.

Se tomaron muestras de 100 mL de agua Milli-RO sobrecargadas con los antioxidantes hasta  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  y se acidificaron hasta el pH deseado utilizando una disolución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) diluido de concentración 1 M o inferior. Estas muestras fueron extraídas con 3 fracciones de hexano en un embudo de decantación: la primera extracción se realizó con 10 mL de hexano durante 10 minutos y la segunda y la tercera con sendas fracciones de 5 mL de hexano durante 5 minutos. El tiempo de reposo para la separación en las fases orgánica y acuosa fue de 8 minutos.

Los resultados obtenidos para estos ensayos, que se realizaron por duplicado, se muestran en la figura 1.

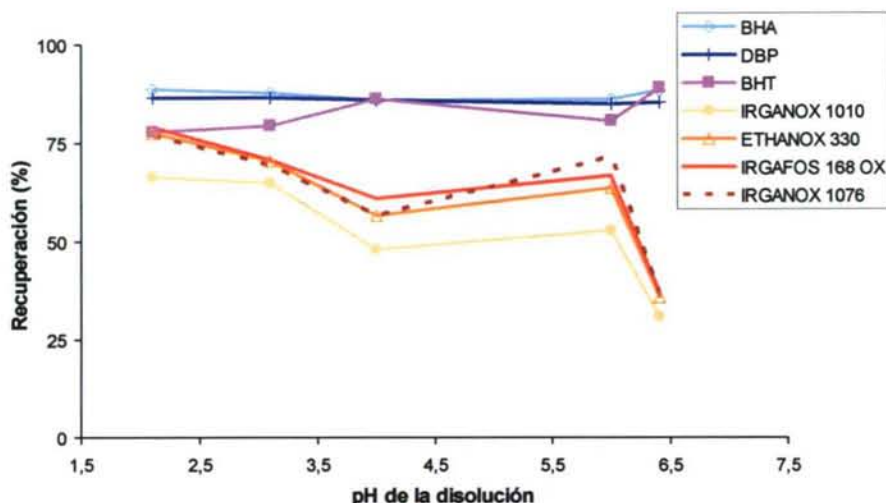


Figura 1. Influencia del pH en la recuperación de los antioxidantes en una muestra acuosa sobrecargada hasta  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  mediante LL-HPLC.

El diferente comportamiento que muestran los compuestos ante la variación del pH hace que puedan diferenciarse dos grupos de compuestos en función de su masa molecular:

- los antioxidantes de menor masa molecular, BHA, DBP y BHT cuya recuperación se mantiene aproximadamente constante, en un intervalo en torno al 80-90% durante todo el rango de pH estudiado sin que se vean afectados por el carácter ácido de la muestra.
- los antioxidantes de mayor masa molecular, Ethanox 330, Irgafos 168, Irganox 1010 e Irganox 1076 cuya recuperación va aumentando a medida que disminuye el pH, alcanzando los mejores resultados cuando el pH de la muestra está en el intervalo 2-3. La extracción de estos compuestos se ve tan fuertemente influida por los cambios de pH que si no se modifica el pH original de la muestra ( $\text{pH} = 6,4$ ) la recuperación de los compuestos es muy baja, en torno al 35%.



Debido a la importancia mostrada por el pH en este ensayo se decidió incluir este factor en el diseño de experimentos a realizar para poner a punto la etapa de extracción LL.

### *Optimización de las variables significativas mediante diseño de experimentos*

Para poner a punto la etapa de extracción LL se seleccionaron 4 factores que podrían afectar potencialmente a la eficiencia de la extracción: tiempo de extracción, volumen de hexano y operador junto al pH de la muestra, que ya ha mostrado tener un efecto importante sobre los resultados obtenidos.

Para discriminar la influencia relativa de estos factores se utilizó un diseño de experimentos Plackett Burman  $2^6 \cdot 3/16$  resolución III cuyos efectos se estudian en 12 experimentos elementales [Montgomery, 1991; Box y col., 1999]. La tabla II muestra los valores correspondientes a los niveles superior (+) e inferior (-) asignados a cada variable en este diseño.

*Tabla II. Niveles de los factores en el diseño de experimentos.*

Factores (unidades)	(-)	(+)
<b>Plackett-Burman <math>2^6 \cdot 3/16</math></b>		
Tiempo de extracción (s)	20	300
Volumen de extracción (mL)	15	30
pH	2	7 (muestra sin acidificar)
Operador	-1	+1
<b>Diseño compuesto central <math>2^3 + \text{star}</math></b>		
Tiempo de extracción (s)	20	300
Tiempo de reposo (minutos)	2	10
pH	2	7



Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron muestras de 100 mL de agua Milli-RO sobrecargadas con antioxidantes hasta 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

La extracción LL se realizó con las condiciones de pH, volumen, tiempo de extracción y operador que se fijaron en el diseño de experimentos para cada experimento elemental (tabla III) con un tiempo de reposo para la separación entre las fases acuosa y orgánica de 8 minutos. El pH de la muestra deseado para cada ensayo fue obtenido por adición de ácido nítrico 1 M.

Tabla III. Matriz de diseño y recuperaciones en el Plackett-Burman 2<sup>6</sup>\* 3/16.

N° exp.	Variables				Recuperación (%)						
	pH	Volumen hexano (mL)*	Tiempo de extracción (s)*	Operador	BHA	DBP	BHT	IGN 1010	E 330	IGF 168 OX	IGN 1076
1	7	5	300	-1	77	77	71	21	34	35	40
2	7	10	20	1	80	83	69	23	34	35	33
3	2	10	300	-1	87	85	77	70	78	77	79
4	7	5	300	1	64	62	49	15	20	13	13
5	7	10	20	1	84	82	76	29	28	30	32
6	7	10	300	-1	81	80	79	22	38	39	41
7	2	10	300	1	85	83	71	65	71	71	70
8	2	5	300	1	82	82	68	66	81	80	84
9	2	5	20	1	79	84	76	36	61	62	68
10	7	5	20	-1	80	84	71	41	48	52	52
11	2	10	20	-1	92	89	88	66	70	72	75
12	2	5	20	-1	86	87	90	58	66	67	73

\* La muestra acuosa se extrae tres veces consecutivas con el volumen de hexano y el tiempo de extracción indicados para cada fracción

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows V. 4.0. La figura 2 muestra las cartas de Pareto estandarizadas para cada compuesto.

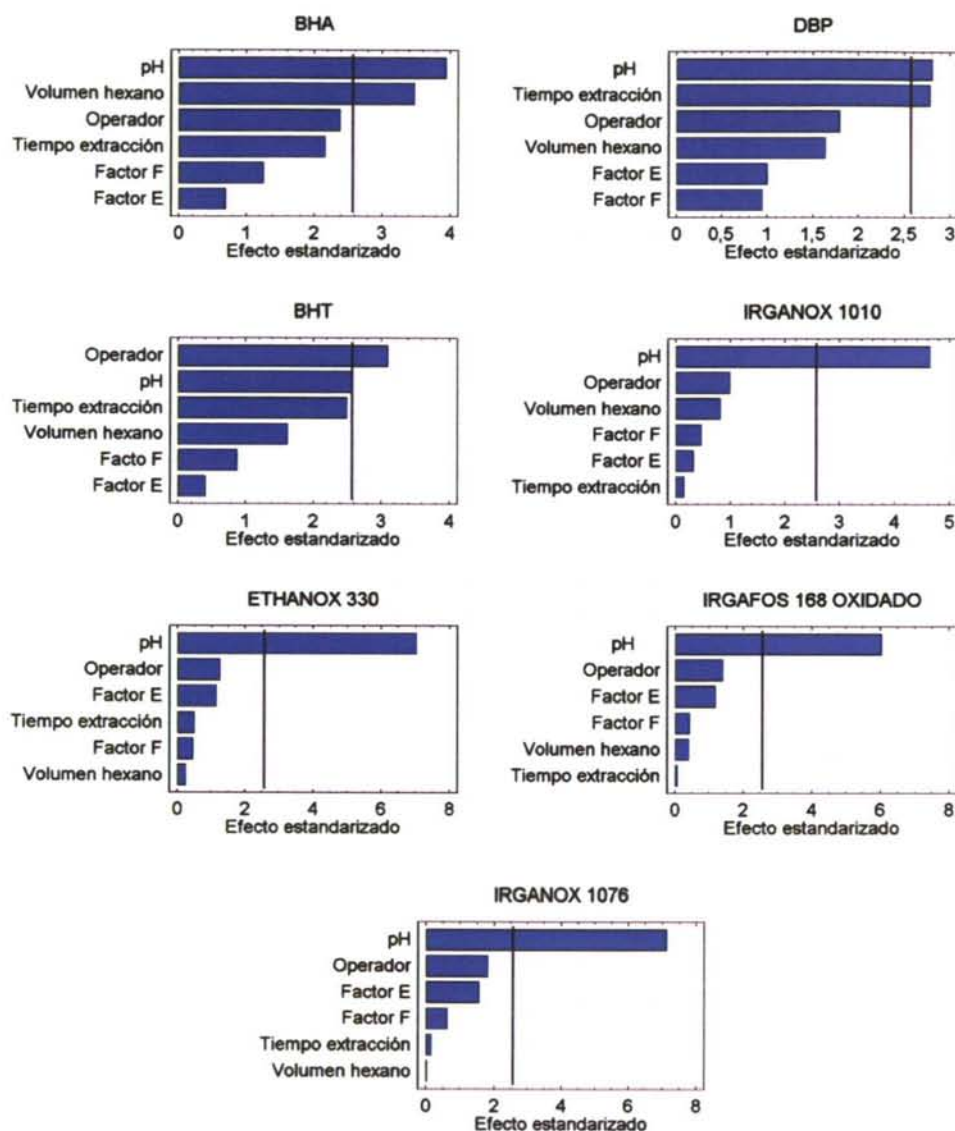


Figura 2. Cartas Pareto de los efectos principales estandarizadas ( $P = 95\%$ ) para el diseño Plackett-Burman.

El pH aparece como el factor que mostró el mayor efecto en la extracción de los antioxidantes, siendo el único estadísticamente significativo para todos los compuestos. Unicamente obtuvo un efecto menor para el BHT, estando en el límite al 95% de resultar estadísticamente significativo. Hay que tener en cuenta que en el estudio

previo el pH no mostraba influencia sobre los compuestos de menor masa molecular.

En lo relativo a los restantes factores considerados sólo alguno de ellos resultó estadísticamente significativo para los compuestos de menor masa molecular: el volumen de hexano para el BHA, el operador para el BHT y el tiempo de extracción para el DBP estando en el límite para ser estadísticamente significativo al 95% para el BHT.

La figura 3 recoge los diagramas de efectos principales para cada antioxidante, en los que se puede ver cómo influyen los factores anteriores en la recuperación de los analitos:

- La disminución del pH logra una mayor recuperación de todos los analitos, siendo más acentuada para los compuestos de mayor masa molecular, que pueden variar desde recuperaciones en torno al 80% para pH 2 hasta el 25% para la muestra sin acidificar. Por el contrario, los compuestos de menor masa molecular aunque se ven favorecidos por el pH ácido, muestran una recuperación en torno al 70% incluso para la muestra sin acidificar. Por lo tanto, los resultados obtenidos son acordes con los mostrados por el estudio previo de modificación del pH.
- El aumento del tiempo de extracción causa una disminución en el porcentaje de recuperación (figura 3), en contra de lo que se esperaba, tanto para el DBP como el BHA, analitos para los que mostró una influencia significativa (figura 2).
- Tanto el volumen de hexano como el operador únicamente tuvieron efecto significativo sobre una variable, por lo que no se consideraron en el segundo diseño de experimentos. El volumen de hexano se fijó en 20 mL, en tres fracciones de 10, 5 y 5 mL respectivamente, tras apreciar que el aumento de volumen producía una mejora en la

recuperación del BHA, único analito para el que tuvo un efecto significativo (figura 2).

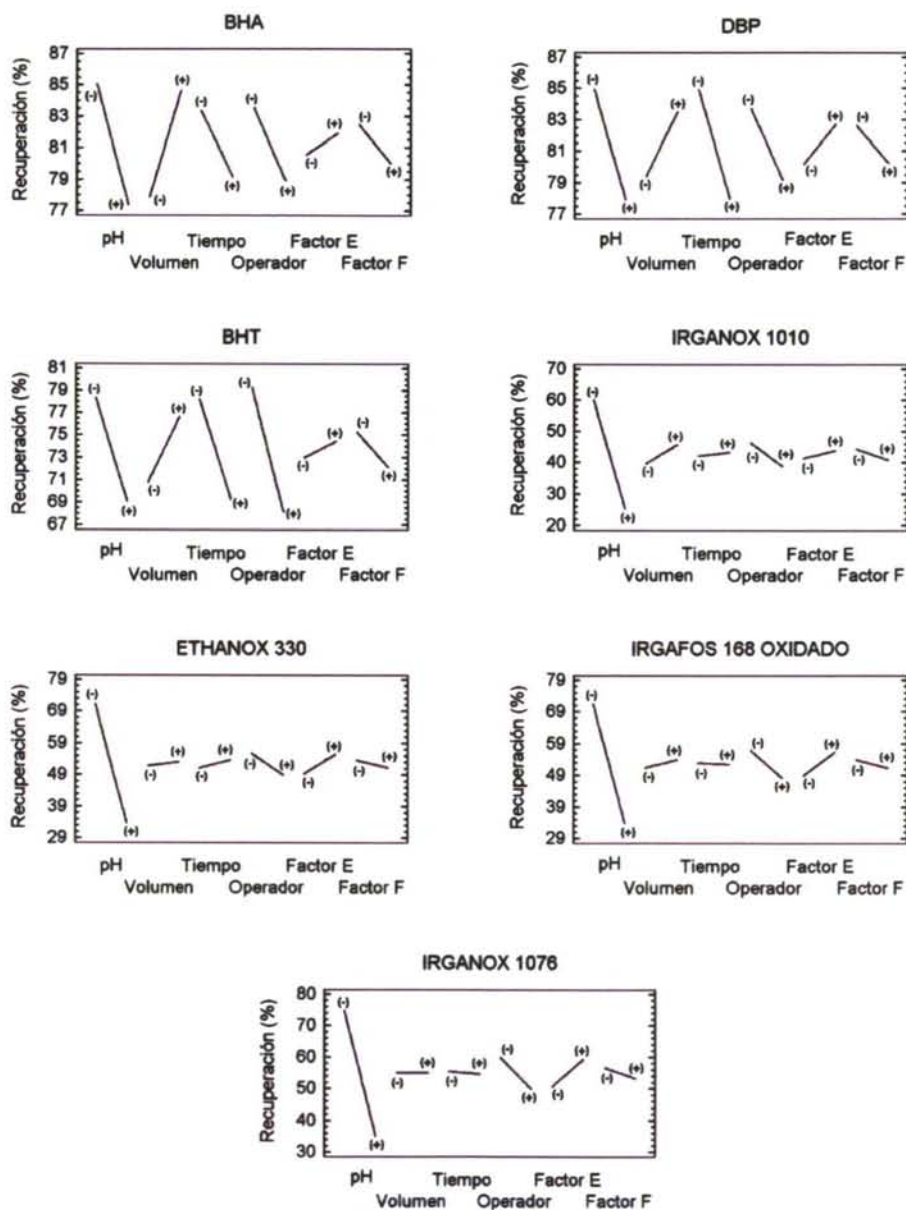


Figura 3. Diagramas de efectos principales de primer orden para el diseño Plackett-Burman.



En la siguiente etapa de optimización del método se consideró una nueva variable, el tiempo de reposo para la separación entre las fases acuosa y orgánica para reducir las emulsiones que podrían afectar a las recuperaciones.

De esta forma se planeó un segundo diseño de experimentos para evaluar el valor más adecuado para cada factor significativo, tiempo de extracción, pH y tiempo de reposo para la separación en dos fases, mediante la aplicación de un diseño compuesto central  $2^3$ +star, que estudia los efectos de estos tres factores en 16 experimentos elementales no randomizados [Montgomery, 1991; Box y col., 1999]. La tabla II muestra los valores superiores (+) e inferiores (-) asignados a cada variable en este segundo diseño. Del mismo modo que en el primer diseño de experimentos, las condiciones de extracción LL se pusieron a punto utilizando un volumen de muestra constante de 100 mL sobrecargado con la muestra de antioxidantes hasta  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ .

El análisis de los datos obtenidos, que se muestran en la tabla IV, se realizó al igual que para el primer diseño por medio del programa estadístico Statgraphics Plus para Windows V. 4.0.

La figura 4 muestra las superficies de respuesta estimadas para cada antioxidante, en las que se puede apreciar que los valores inferiores de pH junto con los tiempos de extracción más altos consiguen los mejores resultados para todos los antioxidantes.

Aunque el tiempo de reposo que se introdujo como tercera variable en este diseño de experimentos no produjo un efecto significativo en la extracción de ningún compuesto, su valor más alto permitió obtener la mejor respuesta para todos los compuestos excepto para el Irganox 1010 y el Ethanox 330 que se obtiene a tiempos de reposo menores.

Tabla IV. Matriz de diseño y recuperaciones en el diseño compuesto central  $2^{3+star}$ .

Nº exp.	Variables			Recuperación (%)						
	pH	Volumen hexano (mL)*	Tiempo de extracción (s)*	BHA	DBP	BHT	IGN 1010	E 330	IGF 168 OX	IGN 1076
1	4,5	160	6	82	78	49	39	41	44	43
2	2,0	20	2	84	87	68	66	79	82	79
3	7,0	20	2	86	85	68	29	30	37	34
4	2,0	300	2	82	85	65	79	81	84	77
5	7,0	300	2	63	63	35	15	36	41	39
6	2,0	20	10	77	85	68	38	60	57	56
7	7,0	20	10	82	77	45	27	38	41	41
8	2,0	300	10	88	89	67	69	77	85	77
9	7,0	300	10	78	77	30	32	43	48	46
10	0,3	160	6	77	85	51	64	62	72	65
11	8,7	160	6	81	82	44	29	35	40	38
12	4,5	0.0	6	20	32	24	22	26	28	26
13	4,5	395	6	92	89	71	62	73	79	76
14	4,5	160	0	80	79	55	30	36	47	39
15	4,5	160	13	92	89	77	60	69	83	68
16	4,5	160	6	87	87	64	43	47	51	51

\* La muestra acuosa se extrae tres veces consecutivas con el volumen de hexano y el tiempo de extracción indicados para cada fracción

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos las condiciones más favorables para el conjunto de los antioxidantes estudiados en la etapa de extracción LL vendrían dadas por el pH de muestra inferior, 0,4 y tanto el tiempo de extracción como el tiempo de reposo más elevados, que se fijaron en 6 y 10 minutos respectivamente.

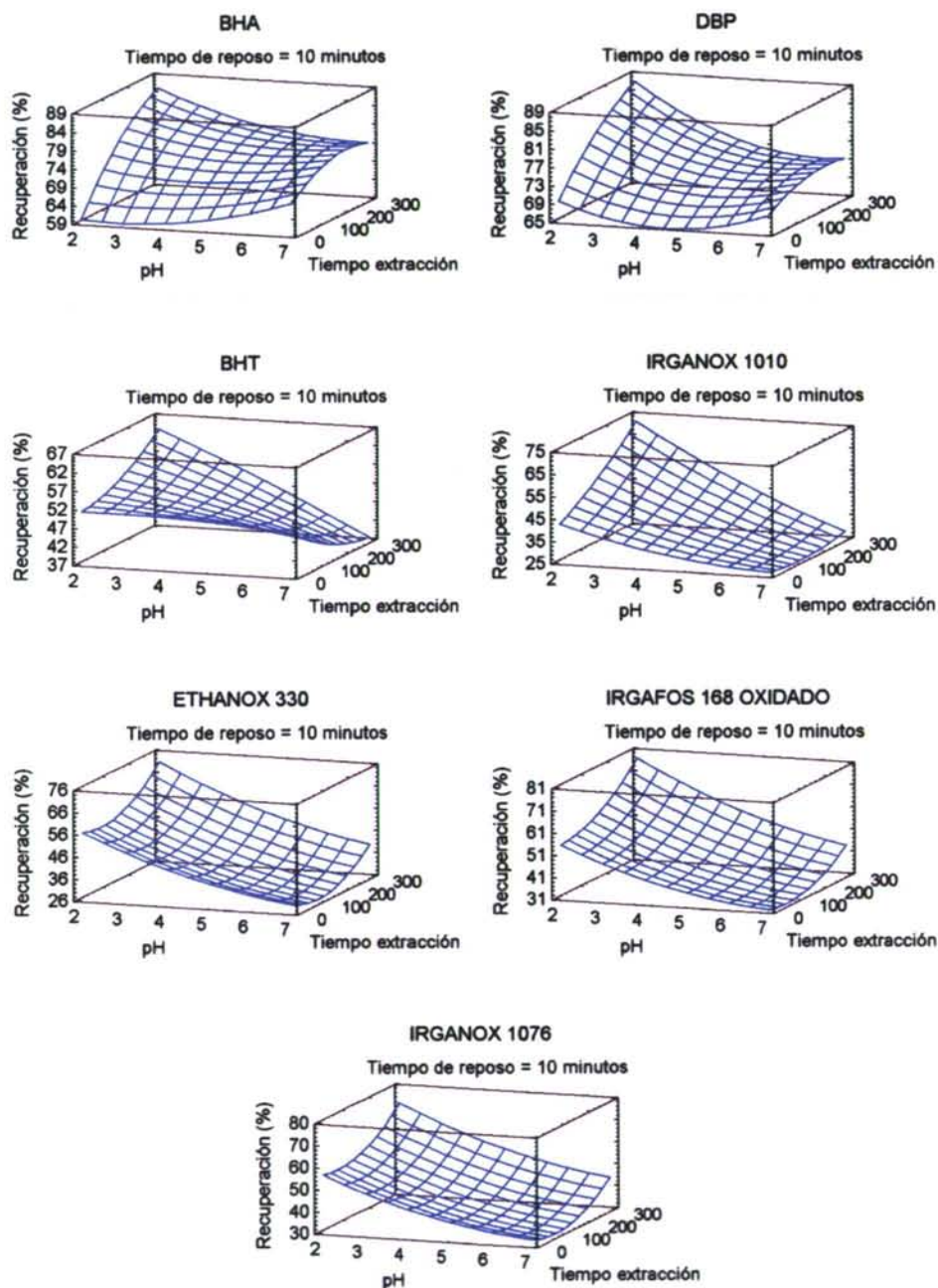


Figura 4. Superficies de respuesta estimadas a partir del diseño compuesto central para pH frente a tiempo de extracción una vez fijado el tiempo de reposo.

## 2.3 Condiciones finales del método analítico LL-HPLC-UV

La tabla V sintetiza las condiciones finales del método desarrollado para la determinación de antioxidantes en el simulante agua mediante extracción LL y posterior análisis cromatográfico mediante HPLC-UV con red de diodos.

Tabla V. Condiciones finales de determinación de antioxidantes en agua mediante LL-HPLC-UV.

MUESTRA ACUOSA acidificada a pH = 0,5	100 mL de simulante A Acidificada a pH = 0,5 con HNO <sub>3</sub> (1 M)
EXTRACCIÓN LL	3 extracciones consecutivas: Volumen hexano = 20 mL (1 x 10 mL, 2 x 5 mL) Tiempo de extracción = 6 minutos Tiempo de reposo = 10 minutos
Fase orgánica	
SECADO DEL EXTRACTO	A través de una columna de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
EVAPORACIÓN	Mediante rotavapor a 200 mbar, 30 °C Hasta la última gota
REDISOLUCIÓN	En 1 mL de acetonitrilo con ayuda de ultrasonidos
HPLC -UV	Método puesto a punto para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos (Cap. IV). Columna Symmetry C <sub>18</sub> Elución en gradiente agua:metanol Volumen de inyección = 20 µL



## 2.4 Precisión del método analítico, límites de detección y de cuantificación.

La tabla VI muestra los resultados del estudio de repetibilidad y límites de detección y cuantificación para el método analítico LL-HPLC-UV puesto a punto. El método desarrollado permite obtener recuperaciones entre 71-88% para todos los antioxidantes excepto para el Irganox 1010, con valores de CV aceptables dentro del intervalo 3,4-13%. Los peores resultados fueron obtenidos para el Irganox 1010 que muestra una recuperación del 66% con un CV del 15%.

*Tabla VI. Repetibilidad del método analítico LL-HPLC-UV (n=6) para una muestra acuosa de 100 mL sobrecargada hasta 0,1 mg L<sup>-1</sup> y límites de detección y cuantificación del método.*

n = 6	Recuperación (%)	CV	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LC (mg L <sup>-1</sup> )
BHA	88	4,3	3,2 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-2</sup>
DBP	88	3,4	3,4 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-2</sup>
BHT	70	8,7	3,9 . 10 <sup>-3</sup>	1,3 . 10 <sup>-2</sup>
Irganox 1010	66	15	2,8 . 10 <sup>-3</sup>	9,2 . 10 <sup>-3</sup>
Ethanolox 330	71	7,1	2,8 . 10 <sup>-3</sup>	9,4 . 10 <sup>-3</sup>
Irgafos 168 ox	76	8,5	3,6 . 10 <sup>-3</sup>	1,2 . 10 <sup>-2</sup>
Irganox 1076	71	13	3,4 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-2</sup>

Los límites de cuantificación del método, en el intervalo 9,2.10<sup>-3</sup>-1,2.10<sup>-2</sup> mg L<sup>-1</sup> para 100 mL de simulante acuoso permiten determinar concentraciones de aditivos muy bajas, si se comparan con el menor LME establecido por la legislación para los compuestos estudiados, 1,5 mg L<sup>-1</sup> para la suma de AO 2246 y AO 425 [Directiva 2002/72/CEE].

## 2.5 Aplicación a muestras comerciales.

El método analítico desarrollado se aplicó para determinar los niveles de migración específica de diferentes muestras comerciales de

PEBD: films para uso alimentario (PEBD1, PEBD2, PEBD3, PEBD4), bolsas de congelado de alimentos (PEBD6) y bolsas de hielo (BI y BII) en el simulante A (agua destilada Milli-RO).

Se llevaron a cabo ensayos de migración específica con exposición de una sólo cara utilizando las celdas de vidrio descritas en el capítulo III para los films y bolsas de congelado de alimentos, y mediante llenado para las bolsas de hielo, de acuerdo con la norma UNE-ENV 13130-1.

En los ensayos realizados en celda de vidrio la relación superficie de contacto del material plástico y volumen de simulante fue de 1 dm<sup>2</sup> y 165 mL respectivamente, que se corresponde con la relación de 0,6 dm<sup>2</sup> para 100 mL de simulante establecida por la legislación europea [UNE-EN 13130-1]. Para los ensayos realizados por llenado de bolsa (bolsas de cubitos de hielo) se calculó la relación de simulante/superficie expuesta para cada caso. De acuerdo con estas relaciones superficie expuesta a volumen de simulante, se recalcularon los límites de detección y cuantificación del método analítico para cada tipo de ensayo (tabla VII).

Tabla VII. Límites de detección y cuantificación del método analítico LL-HPLC-UV considerando la relación de superficie expuesta / volumen de simulante.

	Celdas (mg dm <sup>-2</sup> )		Bolsas I (mg dm <sup>-2</sup> )		Bolsas II (mg dm <sup>-2</sup> )	
	LD	LC	LD	LC	LD	LC
BHA	5,2 . 10 <sup>-4</sup>	1,7 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-4</sup>	3,5 . 10 <sup>-4</sup>	1,2 . 10 <sup>-4</sup>	3,9 . 10 <sup>-4</sup>
DBP	5,5 . 10 <sup>-4</sup>	1,8 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-4</sup>	3,7 . 10 <sup>-4</sup>	1,3 . 10 <sup>-4</sup>	4,2 . 10 <sup>-4</sup>
BHT	6,4 . 10 <sup>-4</sup>	2,1 . 10 <sup>-3</sup>	1,3 . 10 <sup>-4</sup>	4,3 . 10 <sup>-4</sup>	1,4 . 10 <sup>-4</sup>	4,8 . 10 <sup>-4</sup>
Irganox 1010	4,6 . 10 <sup>-4</sup>	1,5 . 10 <sup>-3</sup>	9,3 . 10 <sup>-5</sup>	3,1 . 10 <sup>-4</sup>	1,0 . 10 <sup>-4</sup>	3,4 . 10 <sup>-4</sup>
Ethanox 330	4,6 . 10 <sup>-4</sup>	1,5 . 10 <sup>-3</sup>	9,4 . 10 <sup>-5</sup>	3,1 . 10 <sup>-4</sup>	1,0 . 10 <sup>-4</sup>	3,5 . 10 <sup>-4</sup>
Irgafos 168 ox	5,9 . 10 <sup>-4</sup>	2,0 . 10 <sup>-3</sup>	1,2 . 10 <sup>-4</sup>	4,0 . 10 <sup>-4</sup>	1,3 . 10 <sup>-4</sup>	4,4 . 10 <sup>-4</sup>
Irganox 1076	5,7 . 10 <sup>-4</sup>	1,9 . 10 <sup>-3</sup>	1,1 . 10 <sup>-4</sup>	3,8 . 10 <sup>-4</sup>	1,3 . 10 <sup>-4</sup>	4,3 . 10 <sup>-4</sup>

Las condiciones de temperatura y tiempo de ensayo seleccionadas fueron de 40 ± 1 °C y 10 días establecidas para el uso del material a

temperatura ambiente por un tiempo no determinado [Directiva 82/711/CEE]. Después de los 10 días de ensayo, el simulante se retira de las celdas y bolsas y se almacena a 4 °C hasta su análisis.

Los niveles de migración específica determinados para cada muestra mediante la aplicación del método analítico desarrollado LL-HPLC-UV (tabla VIII) fueron muy bajos, siendo tan sólo detectados Ethanox 330 e Irgafos 168 oxidado para dos de las muestras analizadas a concentraciones tan pequeñas que estarían por debajo del límite de cuantificación del método.

*Tabla VIII. Resultados de los ensayos de migración específica a partir de muestras de PEBD.*

n = 3	Celdas (mg dm <sup>-2</sup> )					Bolsas de hielo (mg dm <sup>-2</sup> )	
	PEBD1	PEBD2	PEBD3	PEBD4	PEBD6	B I	B II
BHA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DBP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BHT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Irganox 1010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ethanox 330	d	nd	nd	nd	d	nd	nd
Irgafos 168 ox	d	nd	nd	nd	d	nd	nd
Irganox 1076	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = no detectable (<LD)

d= detectable (LD< concentración< LC)

Resultados media de tres réplicas

### 3 EXTRACCIÓN SPE EN LOS SIMULANTES ACUOSOS A, B Y C

En este apartado se estudia la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) como etapa de preconcentración de antioxidantes en los simulantes acuosos A, B y C.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
LABORATORIO DE QUÍMICA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓNS TECNOLÓXICAS

U

## **DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN POLIOLEFINAS Y SUS NIVELES DE MIGRACIÓN**

Memoria presentada por  
**M<sup>a</sup> Sonia Dopico García**  
Para optar al grado de Doctor  
21 de Diciembre de 2004



Como antioxidantes se determinaron los compuestos fenólicos, AO 2246, AO 425, BHA, BHT, Ethanox 330, Irganox 1010 e Irganox 1076, un antioxidante fosfito Irgafos 168 y su producto de degradación DBP.

En el apartado anterior se desarrolló un método de extracción LL de estos antioxidantes, excepto el AO 2246 y el AO 425, con el que se han obtenido algunos de los objetivos planteados, como buenas recuperaciones y una reproducibilidad adecuada para la mayoría de los antioxidantes con límites de detección muy bajos. Pero alguno de los compuestos objeto de estudio no presentan un comportamiento todo lo bueno que cabría esperar, de lo que son muestra el Irganox 1010 con una recuperación del  $66\% \pm 15$  y el Irganox 1076 con una recuperación del  $71\% \pm 13$ . Por ello ahora se centra el interés en desarrollar un método de SPE que nos ofrezca mejores resultados, además esta técnica ofrece ciertas ventajas con respecto a la extracción LL como son su menor tiempo de procesado, una sustancial reducción del volumen de disolventes y su posible automatización [Hennion, 2000]. Por otra parte, se busca desarrollar un método aplicable a los tres simulantes acuosos, A, B y C.

### **3.1 Preparación de disoluciones patrón**

Se prepararon disoluciones patrón madre individuales ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de los 9 antioxidantes estudiados de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo IV. A partir de estas disoluciones individuales se obtuvieron las disoluciones patrón de trabajo mezcla de todos los compuestos por dilución con acetonitrilo, que se utilizaron para sobrecargar las muestras de simulante con las que se puso a punto el método.

### **3.2 Ensayos preliminares mediante SPE**

A pesar de las ventajas que ofrece la SPE frente a la extracción LL, en la bibliografía revisada no se ha encontrado ningún método que emplee

la SPE para llevar a cabo la preconcentración de los antioxidantes estudiados, por lo que teniendo en cuenta que la mayoría de los compuestos a determinar son derivados del fenol se ha consultado el acondicionamiento de muestras para el análisis de compuestos fenólicos a partir de matrices acuosas utilizando SPE con diferentes rellenos.

De acuerdo con la bibliografía, dos procedimientos habituales para mejorar las recuperaciones obtenidas en la SPE de compuestos de naturaleza fenólica a partir de agua son:

- La modificación del pH de la muestra [Turnes y col., 1994 y Wissiack y col., 2000] como se comentó anteriormente, en el apartado 2 de este capítulo.
- La derivatización de los analitos previa a su extracción. De acuerdo con Rodríguez y col. (2000) las reacciones de derivatización de fenoles se pueden utilizar para incrementar la eficiencia de los procedimientos de SPE al mejorar las interacciones en fase inversa. Entre las técnicas de derivatización una de las reacciones más aplicadas es la acetilación de fenoles con anhídrido acético en presencia de carbonato [Bao y col., 1996] o hidrógenocarbonato [Boyd, 1994; Llompart y col., 2002].

En cuanto al tipo de rellenos utilizados para la SPE, los materiales no polares en fase inversa se utilizaron los primeros en la SPE de fenoles en agua permitiendo obtener buenas recuperaciones si se incluía la etapa de derivatización previa a la SPE [Janda y Van Langenhove, 1989; Boyd, 1994]. Posteriormente, este procedimiento de derivatización previo también se utilizó con otro tipo de rellenos, como el copolímero estireno-divinilbenceno [Jahr, 1998] y carbón negro [Rodríguez y col., 1997] para la SPE de compuestos fenólicos.

Considerando que la etapa de derivatización se incluye con diferentes rellenos de SPE y que entre estos últimos las fases enlazadas de alquilsílices presentan buena reproducibilidad en tiempo de retención,

rápido equilibrio con la fase móvil y en muy pocos casos adsorción irreversible de los solutos [Henion, 2000], se decidió estudiar la SPE con el relleno  $C_{18}$  para la determinación de los antioxidantes.

Se realizaron ensayos preliminares de SPE para observar la retención del relleno en diferentes condiciones, en los que la etapa de elución se llevó a cabo probando una amplia gama de disolventes de diferente polaridad, entre los que se encuentran acetonitrilo, metanol y THF:

- Extracción directa de la muestra: el relleno  $C_{18}$  sólo obtuvo buenos resultados para los compuestos de baja masa molecular mientras que los restantes apenas se retuvieron.
- Con acidificación de la muestra previa a la SPE con ácido nítrico hasta pH en torno a 3: aunque el relleno retuvo los antioxidantes, estos no pudieron ser eluidos.
- Con basificación de la muestra previa a la SPE: no se consiguió obtener buenas recuperaciones para todos los compuestos.
- Con derivatización mediante acetilación con anhídrido acético: fue la técnica que permitió obtener mejores recuperaciones, por lo que se estudió con mayor profundidad.

#### *Estudio de la acetilación de fenoles para la SPE de los antioxidantes*

Se estudiaron las condiciones de acetilación con anhídrido acético más adecuadas, tras comprobar en un primer momento que el medio básico proporcionado por la presencia del  $NaHCO_3$ , permitía obtener mejores resultados que el uso de anhídrido acético por sí sólo.

Tras los primeros ensayos se observó que la reacción de acetilación con anhídrido acético en presencia de  $NaHCO_3$  proporciona porcentajes bajos de recuperación para concentraciones inferiores a las inicialmente



ensayadas de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . La figura 5 muestra las recuperaciones obtenidas para la SPE de antioxidantes a partir de 100 mL de muestra para una concentración alta,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  y para otra de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando como reactivos de derivatización 0,8 g de  $\text{NaHCO}_3$  y  $2 \times 0,100 \text{ mL}$  de anhídrido acético en ambos casos. Como se puede ver, las recuperaciones obtenidas al disminuir la concentración de antioxidantes empeoraron notablemente.

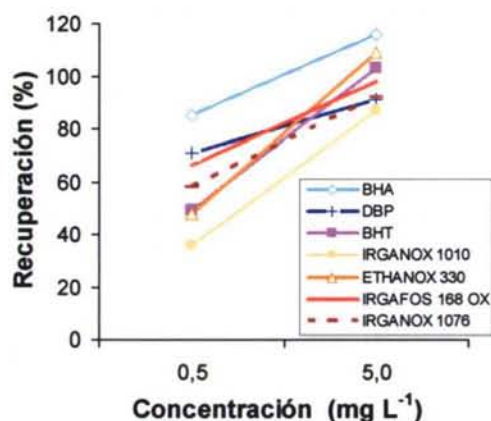


Fig. 5. SPE de antioxidantes con derivatización previa mediante  $\text{NaHCO}_3$  y anhídrido acético.

Se realizaron varios ensayos con diferentes cantidades de los reactivos de derivatización,  $\text{NaHCO}_3$  y anhídrido acético (A, B, C y D) y un nuevo ensayo sustituyendo el  $\text{NaHCO}_3$  por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . En la tabla IX se muestran las condiciones experimentales de los mismos y en la figura 6 los resultados obtenidos. Como se puede observar, el uso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  permite obtener mejores recuperaciones para la mayoría de los compuestos.

Tabla IX. Selección de las condiciones de los reactivos de derivatización.

	A	B	C	D
Base (g)	0,8 g $\text{NaHCO}_3$	1,6 g $\text{NaHCO}_3$	0,8 g $\text{NaHCO}_3$	0,8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Anhídrido acético (mL)	$2 \times 0,250$	$2 \times 0,100$	$2 \times 0,100$	$2 \times 0,100$
Muestra	100 mL de agua sobrecargada hasta $2,5 \text{ mg L}^{-1}$			



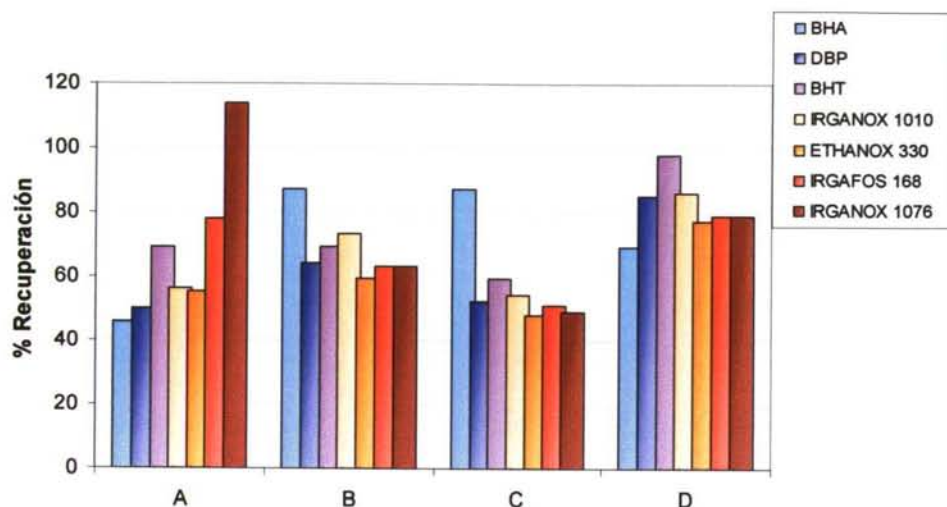


Fig. 6. Recuperaciones obtenidas para la SPE con diferentes condiciones de derivatización.

Si se realiza la SPE previa derivatización según el procedimiento D para diferentes concentraciones de antioxidantes, de forma similar al ensayo realizado con  $\text{NaHCO}_3$  se obtienen buenas recuperaciones para todos los antioxidantes (Fig. 7) independientemente de la concentración de la disolución, a diferencia de lo que ocurría con el  $\text{NaHCO}_3$ , por lo que se opta por la utilización de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y anhídrido acético como reactivos de derivatización.

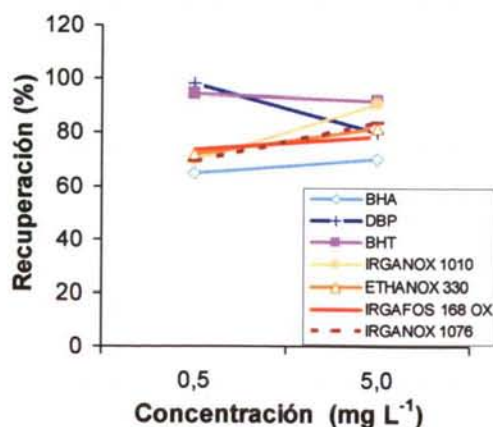


Fig. 7. SPE de antioxidantes con derivatización previa mediante  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y anhídrido acético.

Hasta el momento los ensayos se realizaron utilizando el simulante A, pero el objetivo es encontrar un método que resulte válido para los tres simulantes acuosos, por lo que se realizan ensayos con 100 mL de muestra sobrecargada hasta  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  para todos los antioxidantes empleando los simulantes B (ácido acético al 3%) y C (etanol al 10%), con las condiciones de derivatización de  $0,8 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$  y  $2 \times 0,100 \text{ mL}$  anhídrido acético previa a su extracción SPE en columnas  $\text{C}_{18}$ .

Como se puede ver en la figura 8, al aplicar el método de SPE a los antioxidantes en el simulante B, medio ácido, se obtienen recuperaciones similares o incluso un poco superiores a las del simulante A, agua destilada, en contra de lo que se esperaba porque el ácido acético proporciona un medio ácido que pretende evitarse en la reacción de derivatización con la adición del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

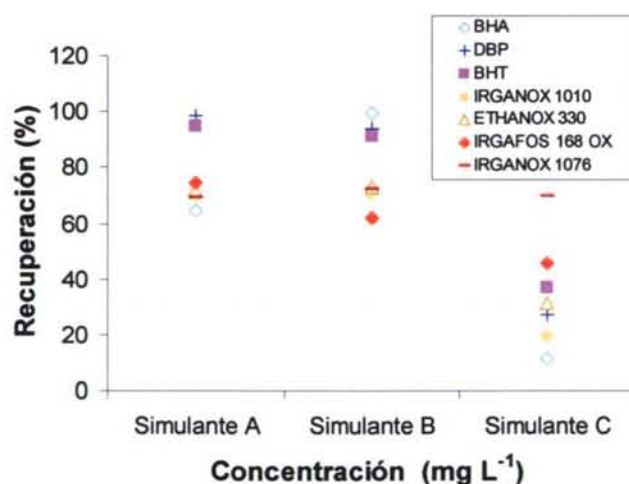


Fig. 8. SPE con derivatización previa mediante  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y anhídrido acético en los simulantes acuosos.

Cuando se trabaja con el simulante C, que contiene etanol al 10%, las recuperaciones disminuyen de forma muy brusca, obteniéndose valores en el intervalo 11-69 %. El único antioxidante que mantiene los porcentajes de recuperación alcanzados en los simulantes A o B es el Irganox 1076, el

compuesto más apolar, lo que indica que la mayor polaridad de los demás compuestos puede estar causando un mayor impedimento para sufrir la reacción de derivatización en presencia de etanol. Por otra parte, de acuerdo con la bibliografía [Hawley, 1992] el anhídrido acético reacciona con los alcoholes para formar acetato de etilo, con lo que el etanol presente en el medio podría estar compitiendo con los fenoles y dificultando la reacción de derivatización.

Por lo tanto el método desarrollado hasta ahora, en el que los antioxidantes son acetilados antes de su SPE con  $C_{18}$ , podría ser aplicable a los simulantes A y B.

Para unificar las etapas de extracción para el simulante A y B se propone el procedimiento de la tabla X, en el que se parte de la muestra acuosa acidificada con ácido acético hasta el 3% (p/v), por lo que en el caso del simulante A es necesario añadirle ácido acético, mientras el simulante B (ácido acético al 3%) no necesita ninguna modificación. Posteriormente los antioxidantes fenólicos se derivatizan con 0,100 mL de anhídrido acético en presencia de 0,8 g de carbonato sódico. Tras hacer pasar la muestra a través de la columna  $C_{18}$ , los analitos retenidos se eluyen con metanol, disolvente utilizado habitualmente para eluir los fenoles retenidos en adsorbentes de sílice [Rodríguez y col., 2000] y THF debido a la gran solubilidad que muestran en él todos los antioxidantes estudiados.

Ensayos posteriores para la SPE de antioxidantes en el simulante C (etanol 10%) pusieron de manifiesto que al retirar los reactivos de derivatización del medio, el anhídrido acético y el carbonato sódico en la SPE de muestras acidificadas con ácido acético hasta el 3% se obtienen recuperaciones altas para todos los compuestos, entre el 66 y el 89%, comparables a las obtenidas para los simulantes A y B con derivatización.

Tabla X. Procedimiento de SPE de antioxidantes a partir de los simulantes A o B con acetilación previa mediante  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y anhídrido acético.

MUESTRA ACUOSA 3% ácido acético	Simulante A o B 100 mL de simulante B ó 100 mL simulante A + ácido acético
↓ ACETILACIÓN	+ 0,100 mL anhídrido acético + 0,8 g de carbonato sódico 5 minutos en ultrasonidos
↓ Acondicionamiento de la columna	4 mL metanol + 4 mL agua
SPE columna $\text{C}_{18}$ Sep-Pack plus 360 mg	Flujo 1 - 2 mL min <sup>-1</sup> (a vacío P = 970 mbar o menos)
↓ Elución de los antioxidantes	Con metanol y THF Los extractos se pasan por separado, se recogen juntos y se mezclan
HPLC -UV	Método puesto a punto para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos (Cap. IV) Columna Symmetry $\text{C}_{18}$ Elución en gradiente agua:metanol Volumen de inyección = 20 µL

Inicialmente estas condiciones de ensayo sin derivatización con anhídrido acético parecen extensibles a los simulantes A y B, si antes de la SPE se modifica la matriz inicial hasta alcanzar el 10% de etanol y 3% de ácido acético, proponiéndose un nuevo procedimiento cuyas etapas generales se indican en la tabla XI.

De esta forma, el método para la SPE de antioxidantes (tabla XI) a partir del simulante A, B o C pudo ponerse a punto de forma conjunta, llevando a cabo los estudios de determinación del volumen de elución,



volumen de ruptura y repetibilidad del método que se describen a continuación.

Tabla XI. Procedimiento de SPE de antioxidantes a partir de los simulantes A, B o C con acidificación previa de la muestra y adición de etanol.

<pre> graph TD     A[MUESTRA ACUOSA 3% ácido acético 10% etanol] --&gt; B[Acondicionamiento de la columna]     B --&gt; C[SPE columna C<sub>18</sub> Sep-Pack plus 360 mg]     C --&gt; D[Elución de los antioxidantes]     D --&gt; E[HPLC -UV]         </pre>	Simulante A, B o C Simulante A + ácido acético + etanol Simulante B +etanol Simulante C + ácido acético
	4 mL metanol + 4 mL agua
	Flujo 1 - 2 mL min <sup>-1</sup> (a vacío P = 970 mbar o menos)
	Con metanol y THF
	Método puesto a punto para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos (Cap. IV) Columna Symmetry C <sub>18</sub> Elución en gradiente agua:metanol Volumen de inyección = 20 µL

### 3.3 Puesta a punto de la etapa de SPE

#### Determinación del volumen de elución

Se pretende determinar el volumen mínimo necesario de los dos disolventes seleccionados, metanol y THF, que garantice la completa elución de todos los antioxidantes. Se realizaron una serie de ensayos en los que se aplicaron diferentes volúmenes de elución, en el rango de 2 a 10 mL empleando volúmenes iguales de metanol y THF en cada ensayo. En el primero se utilizaron 10 mL de metanol y 10 mL de THF y en el último 2 mL

de metanol y 2 mL de THF. Ambos eluyentes se adicionaron por separado a través de la columna y se inyectaron también de forma independiente para evaluar el efecto que produce cada disolvente en la recuperación de los analitos.

Se utilizaron muestras de 100 mL de agua Milli-Ro sobrecargada con los antioxidantes hasta  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y modificadas con ácido acético hasta el 3% y etanol hasta el 10%. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos.

En las gráficas representadas en la figura 9 se puede ver tanto la recuperación final cuando se suman los resultados de los dos extractos de cada ensayo, metanol y THF, como la recuperación que alcanza cada disolvente por sí solo. A la vista de los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones:

- Los niveles de recuperación obtenidos son aproximadamente constantes (entre 70 y 100 %) cuando el volumen total es mayor o igual que 8 mL (4 mL de metanol + 4 mL de THF).
- Cuando el volumen total es menor que 8 mL las recuperaciones alcanzadas con metanol disminuyen desde un rango de 55-99% hasta 29-89% mientras que las recuperaciones con THF aumentan desde un rango entre 0 - 20% hasta 0 - 46% ya que este último disolvente está eluyendo los analitos que el menor volumen de metanol utilizado no consiguió recuperar.
- Un volumen de elución mínimo de metanol de 4 mL permite obtener las mejores recuperaciones para la mayoría de los antioxidantes objeto de estudio.
- Existen compuestos que son mejor eluidos con metanol que con THF como el BHA y el Irganox 1010. Ambos antioxidantes no son recuperados con THF incluso cuando sólo se emplean 2 o 3 mL de

metanol en la primera elución y cantidades significativas de BHA (25-30%) e Irganox 1010 (23-32%) permanecen en el cartucho de SPE.

- El Irganox 1076 es el analito mejor eluido con THF, ya que con 2 mL de THF sólo queda retenido en la columna el 25% de este antioxidante cuando con 2 mL de metanol permanece retenido el 71% de Irganox 1076.

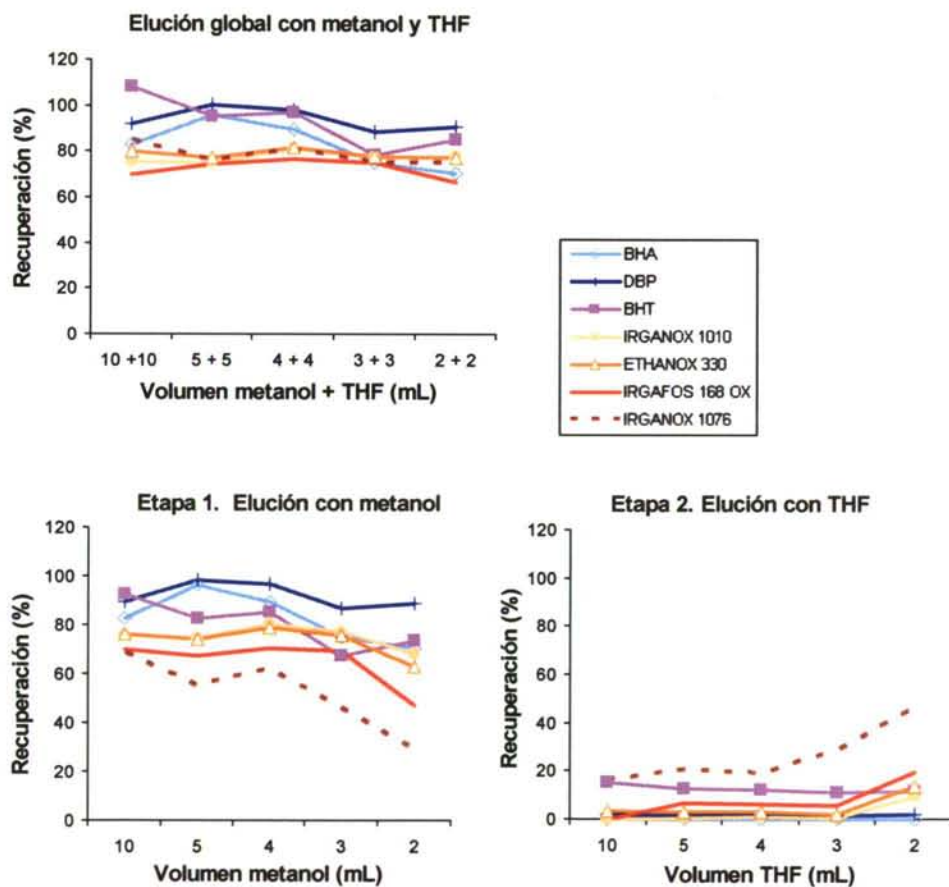


Figura 9. Determinación del volumen de elución para la SPE de antioxidantes.

Teniendo en cuenta estos resultados, se fijó el volumen de metanol en 5 mL con el fin de garantizar la total elución del BHA y del Irganox 1010

cuya recuperación parece ser más favorable con este disolvente y el volumen de THF en 3 mL para asegurar la completa elución de todos los antioxidantes, principalmente el Irganox 1076, por tanto se fija el volumen total de elución en 8 mL.

Se realizó un nuevo ensayo de SPE empleando estos volúmenes finales de elución, 5 mL de metanol y 3 mL de THF, con la diferencia de que tras hacerlos pasar a través de la columna de forma independiente ambos eluatos se recogieron juntos, se mezclaron por agitación y se analizaron de forma conjunta mediante HPLC. Las recuperaciones obtenidas fueron similares a las recuperaciones máximas alcanzadas en los ensayos previos con los volúmenes de elución más altos, (4 + 4), (5 + 5) y (10 + 10) mL.

#### *Determinación del volumen de ruptura*

El ensayo para la determinación del volumen de ruptura se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Hennion (2000). Se preconcentraron volúmenes crecientes de muestras: cada uno contiene la misma cantidad de analitos de tal manera que a medida que el volumen de muestra se incrementa, la concentración del analito disminuye. Inicialmente la cantidad preconcentrada permanece constante, pero cuando se alcanza el volumen de ruptura esta cantidad extraída se reduce.

Este ensayo se realizó con muestras de agua sobrecargadas con 0,05 mg de cada antioxidante modificadas con ácido acético hasta el 3% y etanol hasta el 10%. El volumen de muestra se modifica en el intervalo de 25 a 500 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.

Las recuperaciones alcanzadas para los ensayos entre 25 y 180 mL están en el rango del 78-105%, pudiendo ser consideradas constantes para todos los antioxidantes excepto para el BHT cuya recuperación disminuye



para el ensayo de 180 mL hasta el 47%. Para los restantes antioxidantes, la recuperación disminuye en los ensayos de 250 y 500 mL permaneciendo únicamente constante para el DBP. De acuerdo con esto, 100 mL se puede fijar como un volumen de muestra adecuado para la SPE mediante  $C_{18}$  para todos los antioxidantes considerados, garantizando la retención de los analitos.

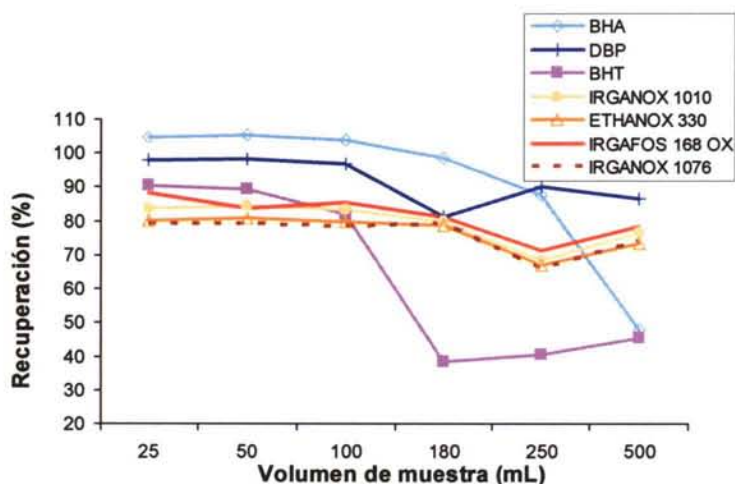


Figura 10. Recuperaciones alcanzadas para el ensayo de volumen de ruptura mediante SPE  $C_{18}$  para muestras con etanol al 10% y ácido acético al 3 % sobrecargadas con 0,05 mg de cada antioxidante.

### 3.4 Condiciones finales del método analítico SPE-HPLC-UV para la determinación de migración específica

En la tabla XII se muestran las condiciones finales válidas para la extracción de antioxidantes en los tres simulantes acuosos, A, B y C mediante SPE y separación y cuantificación por HPLC-UV con red de diodos con el método cromatográfico puesto a punto en el capítulo IV para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos.

Tabla XII. Condiciones finales del método analítico SPE-HPLC-UV.

<div>MUESTRA ACUOSA 3% ácido acético 10% etanol</div>	100 mL de simulante A, B o C Simulante A + ácido acético + etanol Simulante B + etanol Simulante C + ácido acético
↓ Acondicionamiento de la columna	4 mL metanol + 4 mL agua
<div>SPE columna C<sub>18</sub> Sep-Pack plus 360 mg</div>	Flujo 1 - 2 mL min <sup>-1</sup> (a vacío P = 970 mbar o menos)
↓ Elución de los antioxidantes	5 mL metanol + 3 mL THF. Los extractos se pasan por separado, se recogen juntos y se mezclan
<div>HPLC -UV</div>	Método puesto a punto para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos (Cap. IV) Columna Symmetry C <sub>18</sub> Elución en gradiente agua:metanol Volumen de inyección = 20 µL

### 3.5 Precisión, límites de detección y de cuantificación para el método analítico SPE-HPLC-UV

El ensayo de repetibilidad para el método analítico desarrollado SPE C<sub>18</sub>-HPLC-UV se realizó con muestras de 100 mL sobrecargadas con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cada antioxidante, ácido acético hasta el 3% y etanol hasta el 10%. En esta última parte del estudio se incluyeron los antioxidantes fenólicos de masa molecular intermedia, el AO 2246 y AO 425.

En la tabla XIII se muestran los porcentajes de recuperación alcanzados para los nueve antioxidantes entre 84 y 103%, con un CV entre 1,6 y 8,3%.

El método de SPE-HPLC-UV para determinación de antioxidantes en simulantes acuosos proporciona porcentajes de recuperación más elevados que el método LL-HPLC-UV anteriormente propuesto en este capítulo, ya que se habían obtenido recuperaciones en el intervalo del 66 hasta el 88%, y CV en el rango 3,4-15%. Por lo tanto, el método SPE C<sub>18</sub>-HPLC-UV permite obtener mayores recuperaciones con mejor precisión que el método LL.

*Tabla XIII. Repetibilidad y límites de detección y cuantificación del método analítico SPE C<sub>18</sub>-HPLC-UV (n = 7) para una muestra acuosa de 100 mL sobrecargada hasta 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 3% ácido acético y 10% etanol.*

n = 7	Recuperación (%)	CV	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LC (mg L <sup>-1</sup> )
BHA	103	1,6	2,5 · 10 <sup>-2</sup>	8,4 · 10 <sup>-2</sup>
DBP	98	1,8	2,7 · 10 <sup>-2</sup>	8,9 · 10 <sup>-2</sup>
BHT	86	5,0	3,1 · 10 <sup>-2</sup>	1,0 · 10 <sup>-1</sup>
AO 2246	87	4,0	2,8 · 10 <sup>-2</sup>	9,3 · 10 <sup>-2</sup>
AO 425	88	3,2	2,6 · 10 <sup>-2</sup>	8,7 · 10 <sup>-2</sup>
Irganox 1010	89	3,9	2,2 · 10 <sup>-2</sup>	7,4 · 10 <sup>-2</sup>
Ethinox 330	84	3,4	2,2 · 10 <sup>-2</sup>	7,5 · 10 <sup>-2</sup>
Irgafos 168 ox	90	8,3	2,8 · 10 <sup>-2</sup>	9,5 · 10 <sup>-2</sup>
Irganox 1076	85	3,0	2,7 · 10 <sup>-2</sup>	9,1 · 10 <sup>-2</sup>

Los límites de detección y cuantificación, que se han calculado teniendo en cuenta los límites cromatográficos y el factor de concentración de 100 a 8 mL utilizado en la etapa SPE, resultan satisfactorios (tabla XIII), estando incluidos en el rango 2,2·10<sup>-2</sup>- 3,1·10<sup>-2</sup> mg L<sup>-1</sup> y 7,4·10<sup>-2</sup>- 1,0·10<sup>-1</sup> mg L<sup>-1</sup> respectivamente, aunque se pierde sensibilidad respecto al procedimiento mediante extracción LL, con el que se aplicaba un factor de concentración desde 100 mL hasta 1 mL. En cualquier caso los límites alcanzados son bastante inferiores al menor LME establecido por la legislación para estos compuestos, 1,5 mg L<sup>-1</sup> para la suma de AO 2246 y AO 425 [Directiva 2002/72/CEE].



Por otra parte, si se compara el método SPE C<sub>18</sub>-HPLC-UV desarrollado con los método de SPE mediante la derivatización de fenoles a partir de muestras acuosas utilizados por otros autores, puede verse que las recuperaciones obtenidas resultan similares. Así, Bao y col. (1996) obtuvieron recuperaciones en el rango de 75-139% con CV entre el 3 y el 9% para alquil y clorofenoles y valores menores para el fenol y nitrofenol utilizando SPE C<sub>18</sub> de los compuestos acetilados. Rodríguez y col. (1997) alcanzaron recuperaciones en el rango 78,3 - 100,2% con CV entre 4,4 y 13,0% cuando utilizan cartuchos de carbón y recuperaciones en el rango 84,6 y 104,0% con CV entre 6,2 y 11,1% cuando utilizan cartuchos de estireno-divinilbenceno para la SPE de clorofenoles a partir de muestras de agua del grifo.

### **3.6 Aplicación a muestras comerciales**

El método se aplicó a muestras comerciales que se sometieron a los ensayos de migración específica en las celdas de migración de vidrio mostradas en la figura 1 del capítulo III durante 10 días a  $40 \pm 1$  °C.

Se determinaron los niveles de migración específica de muestras de PEBD en los simulantes A, B y C, que se han analizado mediante el procedimiento de extracción LL en el simulante A:

- simulante A: PEBD1, PEBD2, PEBD3, PEBD6.
- simulante B: PEBD1, PEBD2, PEBD3, PEBD4, PEBD5.
- simulante C: PEBD1, PEBD2, PEBD5.

Teniendo en cuenta los bajos resultados que se habían obtenido en los ensayos de migración aplicando el método de extracción LL en el simulante A y que con el método de SPE se ha perdido sensibilidad, en estos nuevos ensayos de migración se pusieron en contacto 2 dm<sup>2</sup> de muestra con 165 mL de simulante, con el fin de aumentar en lo posible la señal de los



antioxidantes en el simulante. En la tabla XIV se muestran los LD y LC en  $\text{mg dm}^{-2}$  para estas condiciones.

Los resultados de los análisis mostraron en todos los casos que los niveles de migración específica de los antioxidantes estudiados estaban por debajo del límite de detección del método.

*Tabla XIV. Límites de detección y cuantificación del método considerando una relación se volumen de simulante/superficie de plástico de 165 mL/2 dm<sup>2</sup>.*

	LD ( $\text{mg dm}^{-2}$ )	LC ( $\text{mg dm}^{-2}$ )
BHA	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$
DBP	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$7,4 \cdot 10^{-3}$
BHT	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$
AO 2246	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-3}$
AO 425	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-3}$
Irganox 1010	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$6,1 \cdot 10^{-3}$
Ethanolox 330	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-3}$
Irgafos 168 ox	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$7,8 \cdot 10^{-3}$
Irganox 1076	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$

#### 4 DETERMINACIÓN DE MIGRACIÓN ESPECÍFICA DE ANTIOXIDANTES EN SIMULANTE D

Evaluar el nivel de migración específica de los antioxidantes estudiados y de cualquier aditivo en general en aceite de oliva resulta extremadamente complejo, debido a la dificultad de separar el analito de la matriz o de reducir las interferencias provocadas por el aceite de oliva.

Estudios de diferentes autores ponen de manifiesto la dificultad de la extracción líquido líquido o en fase sólida de Irganox 1076 en aceite de oliva [O'Brien y col. 1997, Simoneau y Hannaert, 1999]. Entre los trabajos

revisados únicamente se han encontrado dos métodos para la determinación de Irganox 1076 en aceite de oliva:

- O'Brien y col. (1997) determinaron Irganox 1076 en esta matriz mediante HPLC, utilizando un método que posteriormente otros autores emplearon [Cooper y col. 1998, O'Brien y col. 1999], en el que fue necesario un detector de fluorescencia menos sensible a las interferencias debidas al aceite de oliva manteniendo la sensibilidad del aditivo.
- Niebergall y Hartmann (1983) determinaron Irganox 1076 en aceite de coco mediante HPLC después de su disolución en cloroformo, para niveles altos de concentración mínima 50 ppm.

En este trabajo se ha estudiado la aplicabilidad de diferentes técnicas para llevar a cabo la extracción de los antioxidantes en aceite de oliva y evitar la interferencia de la matriz en la determinación cromatográfica de su migración específica en el simulante D.

#### **4.1 Ensayos preliminares**

Debido a la complejidad del análisis en la matriz aceite de oliva en un principio se probaron diferentes opciones:

- Elución mediante cromatografía de exclusión molecular: se utilizó una columna Styragel Waters HR 1 THF 7,8 x 300 mm con un rango de separación efectivo entre las masas moleculares 10 - 5000 que no permitió la separación de los analitos del aceite de oliva.
- SPE mediante dos rellenos de polaridades completamente opuestas: el relleno en fase inversa C<sub>18</sub> y el relleno en fase normal DIOL. Se probaron diferentes condiciones experimentales: elución del aceite directamente a través de la columna o previamente mezclado con algún disolvente para disminuir su viscosidad, en este caso con hexano

o diclorometano. Ninguno de los ensayos realizados permitió obtener buenas recuperaciones para el conjunto de los analitos, consiguiéndose los mejores resultados con una columna DIOL para una muestra de 2 g sobrecargada hasta  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , que se hizo pasar a través de la columna DIOL para después eluir los antioxidantes con 8 mL metanol. Las recuperaciones conseguidas estuvieron entre el 44% del BHA y el 18% del Irgafos 168, disminuyendo para cada compuesto a medida que aumenta su carácter apolar, de manera que el Irganox 1076 no se recuperó en absoluto.

- Extracción LL: con este método se obtuvieron los mejores resultados, por lo que esta técnica se estudió con más detalle.

## 4.2 Extracción LL de antioxidantes en aceite de oliva

Después de realizar varios ensayos en los que se probaron diferentes métodos (decantación, separación en centrífuga, congelación para separar el aceite) y se varió la relación masa de aceite/volumen de disolvente de extracción para mejorar la separación entre fases se fijó la relación 4 g de aceite/ 4 mL de disolvente para cada extracción realizando la separación de ambas fases por centrifugación con un tiempo medio de 10 minutos.

La determinación de los antioxidantes se realizó mediante el método HPLC-UV con red de diodos e inicialmente se utilizó el método desarrollado para determinación de antioxidantes en matrices acuosas.

Se comparó la capacidad de extracción de 4 disolventes de diferentes polaridades: etanol, propanol, metanol y acetonitrilo en los que una muestra de 4 g de aceite de oliva sobrecargada hasta  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  se depositó en un tubo de centrífuga y se extrajo 3 veces con fracciones de 4 mL de disolvente. En la tabla XV se muestran los resultados obtenidos, no se ha incluido el porcentaje de recuperación del Ethanox 330 debido a la coelución que presenta el pico con interferencias del aceite de oliva. Los



valores obtenidos para los demás compuestos muestran que el uso de acetonitrilo, que era el disolvente utilizado por diferentes autores para la extracción de alguno de estos analitos, a partir de aceite de oliva [González y col., 1999; Simoneau y Hannaert, 1999] permite obtener las recuperaciones más altas para la mayoría de los compuestos que se consiguen extraer.

*Tabla XV. Recuperaciones obtenidas para la extracción LL de antioxidantes en una muestra de 4 g de aceite de oliva sobrecargada hasta 10 mg Kg<sup>-1</sup>.*

n = 2	media % recuperación			
BHA	90	85	101	99
DBP	77	80	91	84
BHT	63	60	60	65
AO 2246	74	68	73	73
Irganox 1010	55	34	50	84
Ethanol 330				
Irgafos 168 ox	27	0	0	0
Irganox 1076	0	0	0	0
Disolvente extracción	etanol	propanol	metanol	ACN

Como se puede ver en la tabla XVI el uso de ACN:hexano no consigue mejorar la recuperación de los antioxidantes, por lo que se decide seguir utilizando acetonitrilo.

La etapa de limpieza con relleno C<sub>18</sub> ha conseguido mejorar en cierta medida el aspecto del cromatograma y la pureza de los picos, por lo que se decide mantener esta etapa. Se compara el uso de una columna DIOL con otra de C<sub>18</sub> para esta fase de limpieza optando por el uso de la DIOL porque permite eliminar mayor número de impurezas que la C<sub>18</sub> con menor retención de los analitos.

Por lo tanto el método estudiado incluye las siguientes etapas:



Tabla XVI. Recuperaciones obtenidas para la extracción LL de antioxidantes en una muestra de 4 g de aceite de oliva sobrecargada hasta 5 mg Kg<sup>-1</sup>.

n = 2	media % recuperación	
BHA	102	82
DBP	139	115
BHT	98	91
AO 2246	79	67
AO 425	101	88
Irganox 1010	83	69
Ethanox 330	0	0
Irgafos 168 oxidado	0	0
Irganox 1076	0	0
Disolvente extracción	ACN	ACN:hexano 90:10

- Una muestra de 4 g de aceite de oliva depositada en un tubo de centrífuga se somete a tres extracciones consecutivas con 4+3+3 mL de ACN mediante agitación.
- La fase orgánica y el aceite se separan en centrífuga durante aproximadamente 10 minutos después de cada extracción.
- Los extractos una vez unidos se hacen pasar por una columna DIOL, seguidos de 2 mL de metanol para recuperar todos los analitos.

Se realizan varios blancos de procedimiento (n = 6) para determinar los límites de detección y cuantificación de esta técnica (tabla XVII). Para realizar el estudio de repetibilidad se fija la concentración de la muestra sobrecargada de aceite de oliva en 5 mg Kg<sup>-1</sup> teniendo en cuenta que el LC del método está en el rango 1,4 - 4,3 mg Kg<sup>-1</sup>. En la tabla XVII se muestran las recuperaciones, CV, y límites de detección y cuantificación del método.

Aunque los resultados obtenidos con este procedimiento son bastante buenos en cuanto a nivel de recuperación y variabilidad, sólo han conseguido extraerse 6 de los antioxidantes estudiados. Por otra parte el

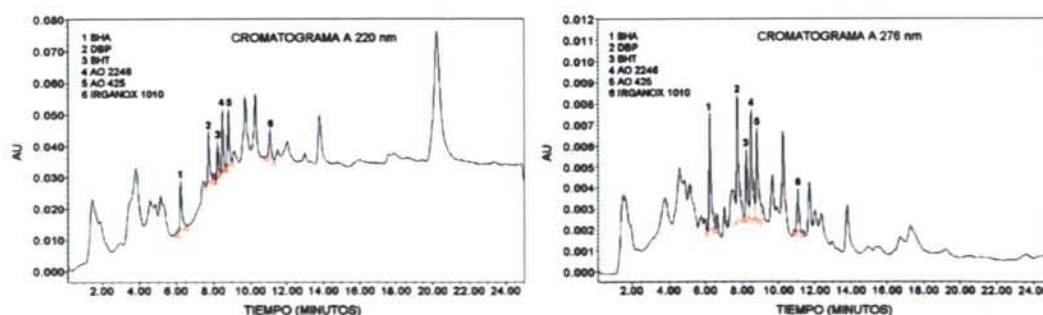
método tiene como desventaja que resulta muy laborioso y su LC es bastante alto, de hecho para el AO 2246 y AO 425 no permitiría determinar niveles de concentración en torno al LME establecido por la legislación, 1,5 mg Kg<sup>-1</sup> [Directiva 2002/72/CEE].

*Tabla XVII. Repetibilidad del método LL-HPLC de extracción de antioxidantes en aceite de oliva (n= 4) para una disolución de 5 mg Kg<sup>-1</sup>.*

n = 4	media	CV	LD (mg Kg <sup>-1</sup> )	LC (mg Kg <sup>-1</sup> )
BHA	94	6,7	1,4	1,4
DBP	59	10	3,7	4,3
BHT	62	6,2	1,3	1,6
AO2246	83	4,7	1,9	2,3
AO 425	77	5,3	2,6	3,5
Irganox 1010	82	4,9	1,6	1,8

LD y LC del método calculados considerando 6 ensayos de blanco de procedimiento

Los cromatogramas de la figura 11, correspondientes a una muestra del ensayo de repetibilidad que fueron extraídos a 220 y 276 nm muestran el alto nivel de interferencias del aceite de oliva que existe a pesar del procedimiento de extracción LL utilizado y posterior etapa de limpieza con columna DIOL.



*Figura 11. Cromatogramas a 220 y 276 nm para una disolución de antioxidantes en aceite de oliva 5 mg Kg<sup>-1</sup> analizada mediante LL-HPLC-UV.*

Tras observar la gran cantidad de compuestos interferentes que presenta la matriz de aceite de oliva se optó por emplear el método cromatográfico indicado en el apartado 3 del capítulo IV. Para ello se sobrecarga una muestra de aceite de oliva con los 9 antioxidantes que se han extraído con acetonitrilo de acuerdo con el método LL desarrollado y se obtiene de este modo el cromatograma de la figura 12.

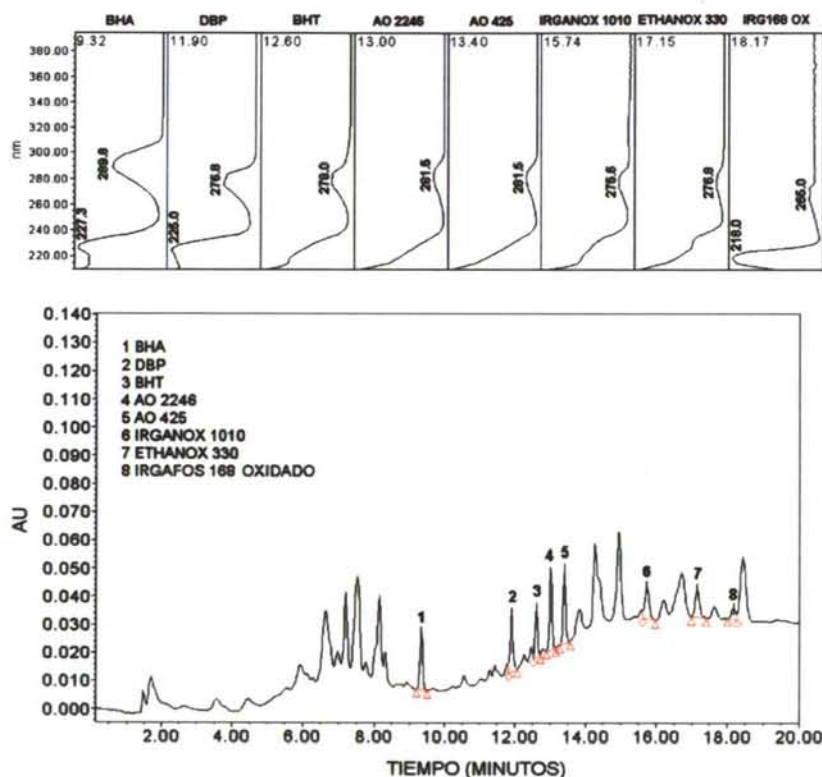


Figura 12. Cromatograma a 220 nm para una disolución de antioxidantes en aceite de oliva  $5 \text{ mg Kg}^{-1}$  analizada mediante LL-HPLC-UV.

El cromatograma obtenido muestra una mejor separación de los picos cromatográficos, pero si se compara con el cromatograma correspondiente a una muestra de aceite diluida sin haberla sometido a ninguna etapa de extracción (capítulo IV, figura 5), se observa que el método de extracción LL permite disminuir la absorción de fondo y el

número de picos cromatográficos ocasionados por el aceite pero tiene como inconveniente que también se está perdiendo señal de los propios antioxidantes.

Tal y como se comentó en el capítulo anterior, con el método cromatográfico para la determinación de antioxidantes en el simulante D, desarrollado en el capítulo IV, es posible cuantificar 8 de los 9 antioxidantes estudiados (ya que el Irganox 1076 no se observa con este método cromatográfico), tras la dilución de la muestra en THF. Así podemos cuantificar la recuperación del Irgafos 168 oxidado y el Ethanox 330, que con el método de extracción LL presentaron una recuperación muy pobre, del 18% para el Ethanox 330 y del 20% para el Irgafos 168.

Considerando las posibles ventajas que podría aportar una posible extracción en columna o líquido líquido previa a la determinación de los antioxidantes en el simulante aceite de oliva se llega a la conclusión de que es mejor no incluir ninguna etapa de extracción o preconcentración previa ya que:

- Con ninguno de los métodos desarrollados se ha conseguido cuantificar el Irganox 1076, y las pérdidas sufridas por el Ethanox 330 e Irgafos 168 oxidado al introducir la etapa de concentración o limpieza mediante extracción LL no justifican tampoco el uso de la extracción LL frente a la dilución del aceite de oliva, salvo a concentraciones muy elevadas.
- Los cromatogramas obtenidos con o sin extracción previa son similares en cuanto al número de picos presentes debidos al aceite de oliva, diferenciándose más bien en su área. El método de LL permite una dilución de la señal de fondo, aunque también disminuye la señal de los analitos.
- El procedimiento de dilución resulta mucho más rápido y sencillo que la etapa de extracción LL.



- Con ambos procedimientos se está diluyendo la concentración de la muestra en igual medida puesto que el procedimiento LL guarda una relación de 4 g aceite/10 mL finales de disolvente y el método cromatográfico emplea la dilución 2 g de aceite/5 mL THF.

Por todo esto se considera que la dilución del aceite de oliva con THF y posterior análisis mediante HPLC-UV con el método en el simulante D sin etapa de extracción o limpieza previas resulta el procedimiento de determinación de migración específica más adecuado, y será utilizado posteriormente para su aplicación a muestras (capítulo VIII).

## 5 CONCLUSIONES

### 5.1 Migración específica en simulantes acuosos

Se han desarrollado dos métodos para la determinación de la migración específica de antioxidantes en muestras acuosas, utilizando las técnicas de extracción LL y SPE.

#### *Procedimiento mediante extracción LL:*

La evaporación mediante rotavapor ha demostrado ser una técnica aceptable para llevar a cabo la preconcentración de antioxidantes sin grandes pérdidas.

El pH produjo un efecto significativo en la extracción LL de los antioxidantes considerados, especialmente para los de mayor masa molecular Ethanox 330, Irgafos 168, Irganox 1010 e Irganox 1076.

Las condiciones óptimas de extracción LL, de acuerdo con el diseño de experimentos factorial, permitieron obtener buenas recuperaciones para

todos los antioxidantes considerados a partir de la matriz acuosa con buena precisión.

#### *Procedimiento mediante SPE:*

Las recuperaciones obtenidas con SPE  $C_{18}$  son mejores que los resultados obtenidos mediante extracción LL de los antioxidantes en el simulante A. Los resultados obtenidos para la extracción LL estuvieron entre el 66 y el 88% con un CV en el rango 3,4 - 13% frente a los resultados conseguidos con el método de SPE, que van desde el 84 y 103%, con un CV entre 1,6 y 8,3%.

Los límites de cuantificación del método analítico SPE-HPLC-UV son menores a 0,10 mg L<sup>-1</sup> para todos los antioxidantes estudiados en 100 mL de muestra. Aunque estos valores han perdido sensibilidad con respecto al procedimiento de extracción LL, siguen siendo bastante inferiores al menor LME establecido por la legislación para los antioxidantes estudiados, 1,5 mg L<sup>-1</sup>, para la suma de AO 2246 y AO 425 [Directiva 2002/72/CEE].

El método es válido para los tres simulantes acuosos establecidos por la legislación (A, B y C) con la condición de modificar la muestra hasta el 3% con ácido acético y hasta el 10% de etanol antes de la SPE.

La SPE  $C_{18}$  permite conseguir altas recuperaciones con buena precisión para todos los antioxidantes fenólicos a partir de muestras acuosas sin necesidad del paso de acetilación previo a la SPE.

Los métodos desarrollados para simulantes acuosos fueron aplicados a la determinación de los niveles de migración específica de diferentes muestras comerciales de PEBD en simulante A mediante extracción LL y en los tres simulantes acuosos A, B y C mediante SPE, demostrando que sus niveles de migración específica estaban muy por debajo de los LME establecidos por la legislación, ya que únicamente el Irgafos 168 oxidado y

el Ethanox 330 pudieron ser detectados a niveles de traza mediante LL en el simulante A.

## 5.2 Migración específica en aceite de oliva

El estudio de la migración específica en el simulante aceite de oliva ha puesto de manifiesto la gran dificultad que conlleva la extracción de los antioxidantes en esta matriz y el evitar las interferencias debidas al aceite de oliva.

Se ha desarrollado un método de extracción LL con acetonitrilo válido para determinar 6 de los antioxidantes estudiados en aceite de oliva pero debido a los inconvenientes que comporta este procedimiento, se propone la dilución del aceite de oliva previa a su determinación cromatográfica, que permite la determinación de todos los compuestos excepto el Irganox 1076.

El no incluir una etapa de extracción LL aporta otras ventajas como son su sencillez y rapidez. Los límites de cuantificación obtenidos permiten determinar los compuestos objeto de estudio (excepto el Irganox 1076) a niveles inferiores a sus LME, mientras que incluyendo la extracción LL no se consigue para el AO 2246, AO 425, Ethanox 330 e Irgafos 168.

En ninguno de los ensayos realizados se ha conseguido determinar el Irganox 1076.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC Official Method 983.15. Phenolic antioxidants in oils, fats and butter oil. Liquid chromatographic method. IUPAC-AOAC Method. Fazio, Thomas, ed., (1995). Vol. II. Cap.47, p. 2-5.



Baner, L.; Franz, R. y Piringer, O. (1994) Alternative methods for the determination and evaluation of migration potential from polymeric food contact materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 90 (5), 137-142.

Bao, M.L.; Pantani, F.; Barbieri, K.; Burrini D. y Griffini, O. (1996) Direct acetylation followed by solid-phase disk extraction and GC-ITDMS for the determination of trace phenols in water. *Chromatographia*, 42 (3/4), 227-233.

Berg, B.E Hegna, D.R. Orlie, N. y Greibrokk, T. (1992) Preliminary study of specific migration of polymer additives from polypropylene to an acid-based food simulant. Short communications. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 837-839.

Berg, B.E.; Hegna, D. R.; Orlie, N. y Greibrokk, T. (1993) Determination of low levels of polymer additives migrating from polypropylene to food simulated liquids by capillary SFC and solvent venting injection. *Chromatographia*, 37 (5/6), 271-276.

Box, G.E.P.; Hunter, W.G. y Hunter, J.S. (1999) Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. 1º edición, Ed. Reverté, Barcelona-Bogotá-Buenos Aires-Caracas-México. Cap. 12. Diseños factoriales fraccionales a dos niveles, p. 385-430 y cap. 15. Métodos de superficie de respuesta, p. 525-554.

Boyce, M.C.; Spickett, E.E. (1999) Separation of food grade antioxidants (Synthetic and natural) using mixed micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1970-1975

Boyd, T.J. (1994) Identification and quantification of mono-, di- and trihydroxybenzenes (phenols) at trace concentrations in seawater by



aqueous acetylation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, 662, 281-292.

Cooper, I., Goodson, A. y O'Brien, A. (1998) Specific migration testing with alternative fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15, 72-78.

Demertzis, P.G., y Franz, R. (1998) Development of an HPLC method for measurements of the stability of Irganox-type polymer antioxidants in fatty food simulants. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*, 206, 193-198.

Directiva 82/711/CEE del Consejo de 18 de octubre de 1982 que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 297, 23/10/1982, p. 26.

Directiva 95/2/CE del Parlamento europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. L 61, 18/3/1995, p.1.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 220 de 15/8/2002, p.18. Rectificación DO L39 de 13/2/2003, p.1. Directiva 2004/1/CE de la Comisión de 6 de enero de 2004, L7 de 13/1/2004, p. 45. Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004, L71, 10/3/2004, p. 8.

Dupeyron, S.; Astruc, M. y Marbach, M. (1995) Automated solid-phase extraction for routine determination of phenol and chlorophenols at trace

levels in water by high-performance liquid chromatography. *Analisis*, 23, 470-473.

Garde, J.A.; Catalá, R. y Gavara, R. (1998) Global and specific migration of antioxidants from polypropylene films into food simulants. *Journal of Food-Protection*, 61, 1000-1006.

González, M.; Gallego, M. y Valcárcel, M. (1999) Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods. *Journal of Chromatography A*, 848, 529-536.

Hawley, G.G. (1992) Diccionario de Química y de Productos Químicos. *Ediciones Omega*, S.A., Barcelona, España.

Heberer, T. y Stan, H.J. (1997) Detection of more than 50 substituted phenols as their t-butyldimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 341, 21-34.

Hennion, M.C. (2000) Sample handling strategies for the analysis of organic compounds in environmental water samples en Barceló (Editor), Sample Handling and trace analysis of pollutants techniques, applications and quality assurance, *Elsevier*, Ámsterdam, Laussane, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, p. 4-71.

Jahr, D. (1998) Determination of alkyl, chloro and moninitrophenols in water by sample-acetylation and automatic on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 47 (1/2), 49-56.

Janda, V. y Van Langenhove, H. (1989) Determination of chlorophenols in water by direct acetylation and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*, 472, 327-330.

Karovicová, S. y Simko, M. (2000) Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. Review, *Journal of Chromatography A*, 882, 271-281.

Llompart, M.; Lourido, M.; Landín, P.; García-Jares, C. y Cela, R. (2002) Optimization of a derivatization-solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A*, 963, 137-148.

Marcato, B.; Guerra, S.; Vianello, M. y Scalia, S. (2003) Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 217-225.

Masqué, N.; Marcé, R.M. y Borrull, F. (1998) Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 793, 257-263.

Montgomery, D.C. (1991) Diseño y análisis de experimentos. *Grupo Editorial Iberoamérica*, Mexico, D.C. Cap. 11. Diseños factoriales y fraccionarios de dos niveles, p. 299-346 y cap. 16. Métodos y diseños de superficies de respuesta, p. 467-510.

Moskovkin, A.S. (2002) Chromatographic-Mass-Spectrometric determination of toxic substances liberated from polymeric materials. *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (6) 507-512.

Niebergall, H. y Hartmann, M. (1983) Untersuchungen zur Analytik und spezifischen Migration von antioxidantien und weichmachern. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 17, 254-262.



O'Brien, A.P., Cooper, I. y Tice, P.A. (1997) Correlation of specific migration (Cf) of plastic additives with their initial concentration in the polymer (Cp). *Food Additives and Contaminants*, 14, 705-719.

O'Brien, A., Goodson, A. y Cooper, I., (1999) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for high density polyethylene (HDPE). *Food Additives and Contaminants*, 16, 367-380.

O'Brien, A. y Cooper, I. (2001) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for polypropylene. *Food Additives and Contaminants*, 18 (4), 343-355.

O'Brien, A. y Cooper, I. (2002) Practical experience in the use of mathematical models to predict migration of additives from food-contact polymers. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 63-72.

Patsias, J. y Papadopoulou-Mourkidou, E. (2000) Development of an automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices *Journal of Chromatography A*, 904, 171-188.

Riquet, A.M; Scholler, D y Feigenbaum, A. (2002) Tailoring fatty food simulants made from solvents mixtures (2): determining the equivalent migration behaviour of olive oil and of solvents in the case of polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 582-593.

Rodríguez, I.; Mejuto, M.C; Bollain M.H y Cela, R. (1997) Evaluation of two solid-phase extraction procedures for the preconcentration of



chlorophenols in drinking water. *Journal of Chromatography A*, 786, 285-292.

Rodríguez, I.; Llompart, M.P. y Cela, R. (2000) Solid-phase extraction of phenols. *Journal of Chromatography A*, 885, 291-304.

Simoneau, C. y Hannaert, P. (1999) Stability testing of selected plastics additives for food contact in EU aqueous, fatty and alternative simulants. *Food Additives and Contaminants*, 16 (5), 197-206.

Spyropoulos, D. V. (1998) Stability testing of the plastics additives 2,4-dihydroxybenzophenone, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone, 2-hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone, 2-ethoxy-2-ethyloxanilide (tinuvin 312) and 2,2'-methylenbis(4-methyl-t-tert-butyl phenol) in aqueous and fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15 (3), 362-369.

Tombesi, Norma B. y Freije, Hugo N. (2002) Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water. *Journal of Chromatography A*, 963, 179-183.

Turnes, M.I.; Rodríguez, I.; Mejuto, M.C. y Cela, R. (1994) Determination of chlorophenols in drinking water samples at the subnanogram per millilitre level by gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Chromatography*, 683, 21-29.

UNE-ENV 13130-1 Septiembre 2000. Versión en español de la Norma Europea Experimental ENV 13130-1 de marzo 1999. Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias plásticas sujetas a limitaciones. Parte 1: guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de

alimentos, determinación de sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes de alimentos.

Wissiack, R.; Rosenberg, E. y Grasserbauer, M. (2000) Comparison of different sorbent materials for on-line solid-phase extraction with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of phenols. *Journal of Chromatography A*, 896, 159-170.

Zhi, Z.L. Ríos, A. y Valcárcel, M. (1996) Continuous-flow method for the determination of phenols at low levels in water and soil leachates using solid-phase extraction for simultaneous preconcentration and separation. *Analyst*, 121, 1-6.

***Capítulo VI***  
***Determinación de antioxidantes en***  
***muestras de poliolefinas***

---

## Capítulo VI. Determinación de antioxidantes en muestras de poliolefinas

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>215</b>
1.1	Métodos de extracción de antioxidantes a partir de poliolefinas.....	215
1.2	Objetivo .....	219
1.3	Material y equipos.....	220
1.4	Reactivos .....	221
<b>2</b>	<b>Puesta a punto de la extracción de antioxidantes mediante energía de microondas .....</b>	<b>221</b>
2.1	Preparación de disoluciones patrón .....	221
2.2	Preparación de la muestra de plástico aditivado ....	222
2.3	Determinación de los antioxidantes mediante HPLC-UV .....	223
2.4	Puesta a punto de la etapa de extracción mediante diseño de experimentos .....	226
<b>3</b>	<b>Condiciones de extracción finales mediante energía de microondas .....</b>	<b>236</b>
<b>4</b>	<b>Precisión del método, límites de detección y cuantificación. ....</b>	<b>238</b>
<b>5</b>	<b>Estabilidad de Irgafos 168 en diclorometano .....</b>	<b>240</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>241</b>



<b>7</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>242</b>
----------	--	------------

## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Métodos de extracción de antioxidantes a partir de poliolefinas**

Las poliolefinas son estabilizadas por antioxidantes para impedir su degradación durante el procesado y para asegurar que permanezcan estables a largo plazo, empleando generalmente fenoles impedidos en combinación con fosfitos [Thilén y Shishoo, 2000]. Estos compuestos no permanecen inalterados sino que sufren transformaciones químicas y dan origen a numerosos productos de transformación como consecuencia de su actuación para proteger al polímero contra los efectos químicos del oxígeno, el calor y la luz. Por otra parte, el material plástico puede sufrir una pérdida física del antioxidante por difusión, reacciones fotoquímicas, degradación del antioxidante, evaporación o lavado, de manera que el envejecimiento de la poliolefina es más rápido debido a esta pérdida física del antioxidante que a la oxidación térmica y la fotooxidación [Haider y Karlsson, 2002].

Teniendo en cuenta que la pérdida de antioxidantes a partir del plástico o su transformación química a menudo causan fallos en los materiales poliméricos [Thilén y Shishoo, 2000], es necesario disponer de métodos analíticos que permitan determinar la cantidad de antioxidantes sin reaccionar presente en el material plástico que evitará la degradación durante su uso.

Esta información de la cuantificación de antioxidantes en la matriz polimérica es útil además para realizar una predicción teórica del nivel de migración del compuesto al alimento, suponiendo una migración del 100% o bien aplicando uno de los modelos matemáticos que caracterizan la transferencia de masa [Catalá y Gavara, 2002].

En la determinación de antioxidantes en matrices poliméricas se han utilizado métodos de análisis directos como la absorción ultravioleta, espectroscopía infrarroja, fluorescencia, fosforescencia y fluorescencia de rayos X, que generalmente tienen el inconveniente de su baja especificidad [El Mansouri y col., 1998] y métodos que llevan a cabo la determinación cromatográfica de los aditivos, con mayor sensibilidad y especificidad pero precisan una extracción previa de los antioxidantes [Marcato y col., 2000], que es difícil de conseguir en tiempos cortos de análisis [Nielson, 1991].

Diferentes autores proponen metodologías distintas para la extracción de aditivos:

- Extracción a reflujo empleando como disolvente cloroformo [Turner, 1991; Allen y col., 1994] o acetona [Di Pasquale y Galli, 1984], con un tiempo de extracción entre 2 y 4 horas.
- Extracción Soxhlet con diclorometano [Haney y Dark, 1980; El Mansouri y col., 1998; Marque y col., 1998], cloroformo [Dilettato y Arpino, 1989] o metanol [Di Pasquale y Galli, 1984], prolongando la extracción, que precisa entre 5 y 48 horas.
- Disolución del polímero con tetracloruro de carbono seguido de precipitación de la fracción de alta masa molecular con acetona [Vadakkoott y col, 1983] o disolución del polímero con tolueno seguida por precipitación de las cadenas poliméricas con metanol [Baylocq y col., 1985; El Mansouri y col., 1998; Salafranca y col., 1999], con el inconveniente de que a las altas temperaturas necesarias para la disolución se pueden degradar los antioxidantes [El Mansouri y col., 1998].
- Energía de ultrasonidos utilizando como agentes de extracción mezclas de disolventes (ciclohexano:isopropil alcohol o diclorometano: ciclohexano) [Nielson, 1991, 1993] o disolventes puros (diclorometano

o cloroformo) [Marque y col., 1998; Haider y Karlsson, 1999]. Los tiempos de extracción van desde 15 minutos hasta una hora.

Como alternativa a estas técnicas existen otras que permiten reducir tanto los tiempos de extracción como la cantidad de disolvente: extracción mediante fluidos supercríticos (SFE), extracción presurizada de líquidos (PLE) o extracción mediante energía de microondas (MAE) [Marcato y col., 2000].

- Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE) que permite obtener recuperaciones entre el 70 y el 90% [Garde y col. 1998; Zhou y col., 1999; Thilén y Shishoo, 2000; Ashraf-Khorassani y col., 2003], aunque dependiendo del tipo de compuesto pueden ser menores como en el caso del Irganox 1010, 20-40% [Garde y col. 1998] o 63% [Thilén y Shishoo 2000] o del BHT [Zhou y col., 1999], con un tiempo total de extracción que varía desde 30 hasta 90 minutos. El uso de altas temperaturas está condicionado por la estabilidad de los antioxidantes [Pinto y Taylor, 1998].
- Extracción presurizada de líquidos: dependiendo del antioxidante analizado permite alcanzar recuperaciones en el intervalo 50-100% [Vandenburg y col., 1998; Zhou y col., 1999] aunque algunos compuestos como el BHT no se recuperan [Zhou y col., 1999], con tiempos de extracción que varían entre 5 y 30 minutos. El uso de altas temperaturas está limitado por la estabilidad del analito y el punto de fluidez del polímero, que puede verse parcialmente disuelto [Vandenburg y col., 1998].

La SFE y extracción de disolventes presurizada presentan como desventajas que en muchos casos no tienen procedimientos sencillos para eliminar las fracciones de oligómeros solubilizados a partir de la matriz y que no consiguen la completa recuperación de aditivos orgánicos con alta polaridad, mientras que los métodos MAE permiten obtener buenas



recuperaciones de todos los antioxidantes en tiempos bastante cortos [Marcato y Vianello, 2000].

Teniendo en cuenta las ventajas de la extracción mediante energía de microondas frente a las demás metodologías consideradas, se seleccionó esta técnica para estudiar la extracción de varios antioxidantes a partir de una matriz de PEBD, por lo que a continuación se relacionan una serie de métodos propuestos por diferentes autores con MAE, prestando especial atención a las condiciones utilizadas en matrices de PEBD:

- Freitag y John (1990) aplicaron la energía de microondas a la extracción de los antioxidantes Irganox 1010 e Irgafos 168 en muestras de PP, PEBD y PEAD, comparando el uso de dos disolventes, 1,1,1 tricloroetano y la mezcla acetona:n-heptano 1:1. Esta última mezcla de acetona:n-heptano les permitió alcanzar recuperaciones en el intervalo 91-97% en un tiempo que varía de 2 a 6 minutos dependiendo de la matriz utilizada, mientras que el uso de 1,1,1 tricloroetano consiguió recuperaciones entre el 90 y 100% de forma más rápida, en tres minutos.
- Nielson (1991, 1993) estudió la extracción de los aditivos a partir de las poliolefinas PEAD, PEBD y PP utilizando técnicas de energía de microondas y baño de ultrasonidos (con determinación mediante cromatografía líquida). Los tiempos de extracción estuvieron entre 30 y 60 minutos para baño de ultrasonidos e inferiores, en torno a 20 minutos, para horno de microondas obteniendo recuperaciones mayores al 90% para Irganox 1010, Irgafos 168 y Cyasorb UV531. La extracción de antioxidantes a partir de PEBD se llevó a cabo en 20 minutos utilizando diclorometano:isopropanol (98:2). El autor recomienda el uso de diclorometano como disolvente de extracción porque permite temperaturas de extracción inferiores a 50 °C sin perder eficacia lo que resulta de interés en la extracción de

antioxidantes volátiles o fácilmente degradables, como el BHT y los ésteres fosfito.

- Molander y col. (1999) compararon dos métodos de extracción, un método estándar de referencia que emplea la extracción Soxhlet con cloroformo (3 horas y 40°C) y un método de extracción mediante energía de microondas utilizando acetonitrilo (30 minutos y 120°C) para el estudio de los niveles de Irganox 1076 en PEBD. Ambos métodos permitieron obtener recuperaciones en torno al 90%.
- Marcato y Vianello (2000) y Marcato y col. (2003) desarrollaron métodos de extracción a partir de diferentes matrices poliolefínicas sin triturar mediante energía de microondas. Analizaron muestras de PEBD lineal aditivadas con Irganox 1010, Irganox PS802 e Irgafos 168. Los antioxidantes se extrajeron con una mezcla de etilacetato:n-hexano (75:25) durante 15 minutos a 100 °C, y se observó una degradación de los antioxidantes insignificante frente a la producida con otras metodologías tradicionales (como los procedimientos de extracción mediante reflujo de disolventes o disolución del polímero y posterior precipitación).

## 1.2 Objetivo

El objetivo de esta etapa es la cuantificación en una matriz de PEBD de dos antioxidantes, que se añaden habitualmente en las industrias de transformación de forma combinada para estabilizar la poliolefina durante el procesado y posterior tiempo de vida del material plástico: el fenol impedido Irganox 1076 (antioxidante primario) y el fosfito Irgafos 168 (antioxidante secundario). Junto con estos también se determina el producto de degradación oxidado del Irgafos 168, el fosfato de tris[2,4-di-terc-butilfenilo] ya que puede formarse durante el procesado de la poliolefina.

Considerando que la extracción mediante energía de microondas ha permitido a diferentes autores obtener altas recuperaciones de antioxidantes con un tiempo de análisis bastante corto, el método analítico desarrollado combina un primer paso de extracción mediante esta técnica y posterior determinación directa mediante HPLC-UV con red de diodos.

### **1.3 Material y equipos**

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (Waters, Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.
  - Sistema de mezcla a baja presión.
  - Sistema de desgasificación al vacío en línea de cuatro canales.
  - Inyector automático.
- Detector UV con red de diodos (Waters, Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Sistema de recogida y procesado de datos Millenium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,0 x 150 mm empacada con relleno Symmetry C<sub>18</sub>, 3,5 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).
- Sistema de microondas de laboratorio Milestone ETHOS TC (Sorisd, Italia) equipado con un carrusel de 10 bombas.
- Extrusora de doble husillo Brabender DSE 20 (Duisburg, Alemania) con cinco zonas de calentamiento equipada con:
  - Sistema de rodillos Brabender Univex-Take-Off (Duisburg, Alemania).



- Granceadora Brabender (Duisburg, Alemania).

## 1.4 Reactivos

- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Metanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tetrahidrofurano para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Diclorometano para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford MA, USA).
- Papel de filtro N° 40 sin cenizas, Ø = 125 mm (Whatman, Maidstone, Reino Unido).
- Filtros de 45 µm y 4 mm de diámetro (Waters, Mildford, MA, USA).
- Granza de PEBD estabilizado Lupolen 1840H (Basell, USA).
- Antioxidantes: Fosfito de tris(2, 4-diterc-butilfenilo) (Irgafos 168) CAS N° [31570-04-4] y 3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de octadecilo (Irganox 1076) CAS [2082-79-3] de Ciba (Basel, Suiza).

## 2 PUESTA A PUNTO DE LA EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES MEDIANTE ENERGÍA DE MICROONDAS

### 2.1 Preparación de disoluciones patrón

Se prepararon disoluciones patrón individuales (1000 mg L<sup>-1</sup>) en diclorometano para Irganox 1076 e Irgafos 168 y en THF para obtener el derivado oxidado de Irgafos 168, ya que como se comentó anteriormente,



en el apartado 2.1 del capítulo IV, el fosfato de tris[2,4-di-terc-butilfenilo] puede ser obtenido después de 24 horas de su disolución en THF.

Las disoluciones patrón de trabajo se prepararon a partir de las disoluciones patrón individuales de 1000 mg L<sup>-1</sup> por dilución en diclorometano.

## **2.2 Preparación de la muestra de plástico aditivado**

Para preparar la matriz de PEBD aditivada en el laboratorio se utilizó granza de PEBD no estabilizado.

El film de PEBD (150 ± 10 µm de grosor) se obtuvo mediante el procesamiento de la granza en una extrusora de doble husillo con cinco zonas de calentamiento, con el siguiente programa de temperaturas: 200/200/200/200/200 °C y 210 °C en la zona del cabezal de cinta.

El material extruido se obtiene después de las siguientes etapas:

- En primer lugar se realiza una mezcla por agitación de la granza de PEBD con la cantidad de Irgafos 168 e Irganox 1076 necesaria para obtener una concentración de 0,2% (% en masa) para el Irgafos 168 y 0,4% (% en masa) para el Irganox 1076.
- Esta mezcla de granza y aditivos fue re-extruida y granceada repetidas veces (n = 5) para obtener una distribución homogénea de los antioxidantes.
- Parte de la granza aditivada y homogeneizada se extruyó para obtener la primera muestra de film, muestra A, que teóricamente contiene en torno a 2000 µg g<sup>-1</sup> de Irgafos 168 y 4000 µg g<sup>-1</sup> de Irganox 1076.
- Otra porción de granza aditivada y homogeneizada se mezcló con granza de PEBD sin aditivar, en una relación 1:4 y se extruyó de nuevo para obtener una muestra de film, muestra B, con una concentración

teórica de aproximadamente 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irgafos 168 y 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irganox 1076.

### 2.3 Determinación de los antioxidantes mediante HPLC-UV

El análisis de los antioxidantes tras la etapa de extracción se realizó por aplicación del método de HPLC-UV con red de diodos descrito en el capítulo IV para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos.

Para evitar la posible degradación del Irgafos 168 por efecto del THF se prepararon por una parte disoluciones patrón individuales de trabajo de Irgafos 168 oxidado en THF y por otra disolución patrón mezcla de Irganox 1076 e Irgafos 168 en diclorometano.

En las figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas y espectros obtenidos con el método HPLC-UV para una disolución patrón individual de concentración 5  $\text{mg L}^{-1}$  de Irgafos 168 oxidado y para la disolución patrón mezcla de concentración 5  $\text{mg L}^{-1}$  de Irganox 1076 e Irgafos 168 en diclorometano.

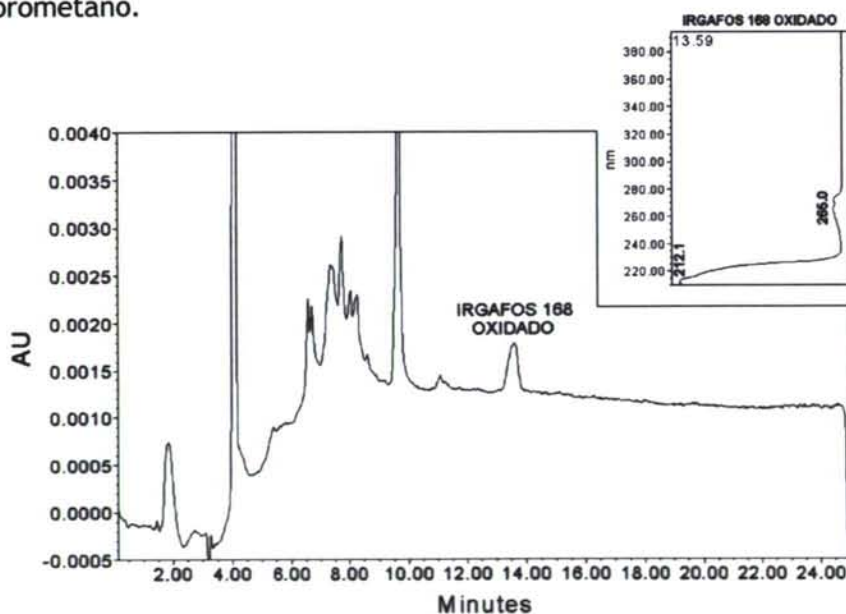


Figura 1. Cromatograma de una disolución patrón de 5  $\text{mg L}^{-1}$  de Irgafos 168 oxidado en diclorometano con su espectro de absorción.

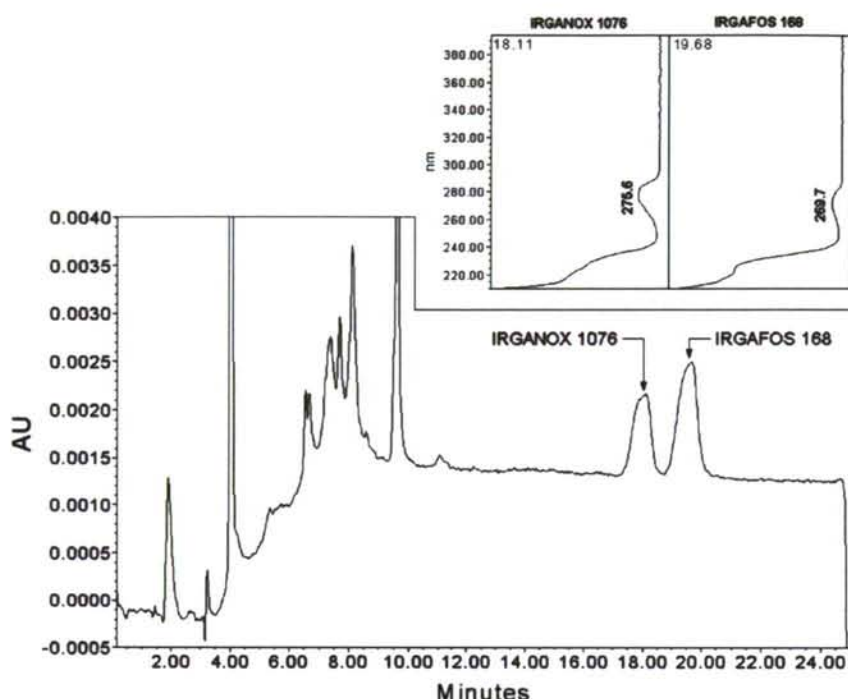


Figura 2. Cromatograma de una disolución patrón de 5 mg L<sup>-1</sup> de Irganox 1076 e Irgafos 168 en diclorometano con sus espectros de absorción.

Se comprobó la linealidad en el intervalo de concentraciones de trabajo, 2,5 y 50 mg L<sup>-1</sup> para Irgafos 168 e Irganox 1076 y entre 2,5 y 15 mg L<sup>-1</sup> para Irgafos 168 oxidado en diclorometano, y se calcularon los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico para cada compuesto (figura 3 y tabla I).

Los límites de detección y cuantificación del Irgafos 168 y del Irganox 1076 son comparables a los obtenidos con anterioridad para los antioxidantes en acetonitrilo (tabla VIII del capítulo IV), mientras que para el Irgafos 168 oxidado han aumentado considerablemente, debido a que el error estándar de la recta ( $S_{y/x}$ ) prácticamente se ha duplicado. No obstante, estos límites se consideran adecuados para la determinación de los compuestos en la matriz poliolefínica, donde su concentración es mucho mayor que los niveles de migración que pueden alcanzarse en el simulante.

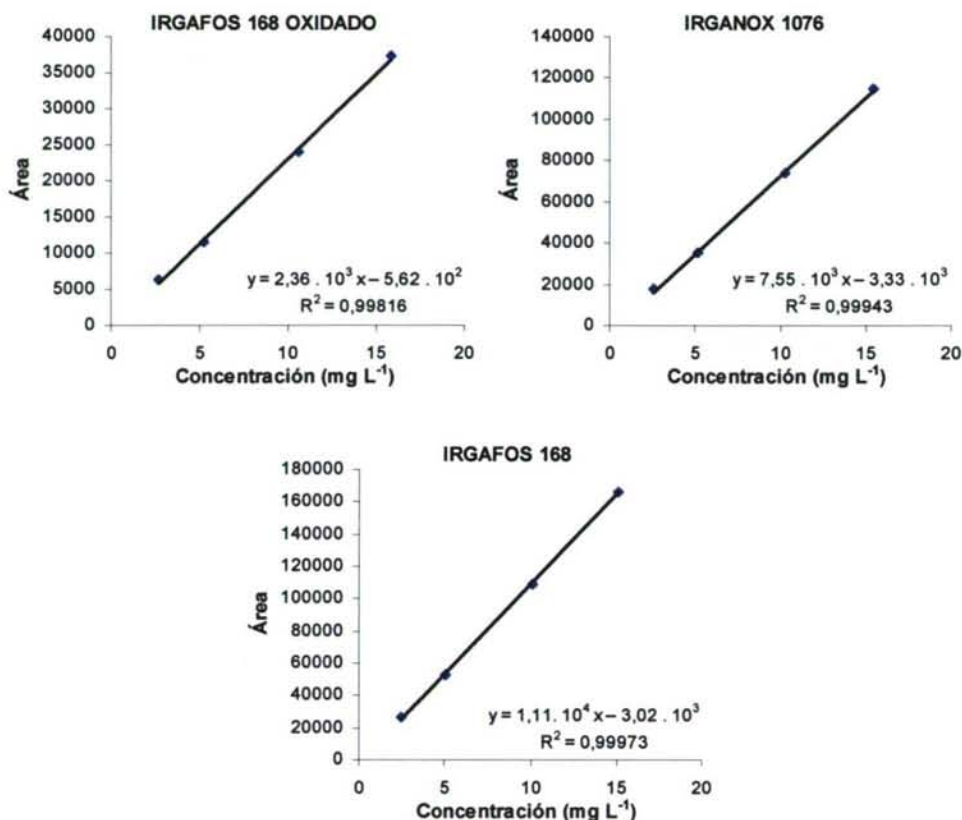


Figura 3. Rectas de calibrado obtenidas mediante ajuste lineal para las disoluciones patrón de antioxidantes con columna Symmetry C<sub>18</sub>.

Tabla I. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación cromatográficos para los antioxidantes en diclorometano.

	$y = Ax + B$	R	R <sup>2</sup>	RSD	S <sub>y/x</sub>	X <sub>LD</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	X <sub>LC</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Irgafos 168 ox	$y = 2,36 \cdot 10^3 x - 5,62 \cdot 10^2$	0,99908	0,99816	70	726	0,92	3,07
Irganox 1076	$y = 7,55 \cdot 10^3 x - 3,33 \cdot 10^3$	0,99972	0,99943	72	1261	0,50	1,67
Irgafos 168	$y = 1,11 \cdot 10^4 x - 3,02 \cdot 10^3$	0,99987	0,99973	71	1254	0,34	1,13

X<sub>LD</sub> concentración correspondiente a  $y_{LD} = y_b + 3 S_b$

X<sub>LC</sub> concentración correspondiente a  $y_{LC} = y_b + 10 S_b$

donde  $y_b$  = área del blanco y  $S_b$  = desviación estándar del blanco. En este caso se ha considerado:

$y_b = B$  (ordenada en el origen de la recta de calibrado)

$S_b = S_{y/x}$  [Miller y Miller, 2002]



## 2.4 Puesta a punto de la etapa de extracción mediante diseño de experimentos

Para poner a punto la etapa extracción de antioxidantes a partir de una matriz de PEBD se llevó a cabo la aplicación secuencial de una metodología de diseño de experimentos que permitió en primer lugar el estudio simultáneo de un elevado número de factores para determinar cuáles de ellos tienen un efecto significativo en la señal analítica, en lugar de utilizar una estrategia tradicional para optimizar cada variable por separado, y en segundo lugar obtener el valor más adecuado para cada variable seleccionada con un número de experimentos relativamente bajo, teniendo en cuenta la interacción de los efectos entre las variables en el óptimo.

Se utilizó un diseño Plackett-Burmann con el fin de seleccionar las variables que tienen influencia en la etapa de extracción, y posteriormente, un modelo estadístico compuesto central para determinar el valor más adecuado para cada variable.

En la realización experimental de todos los ensayos el procedimiento analítico fue similar: se pesó una muestra de film entre 0,5 - 2 g, se cortó (0,5 x 1 cm) y se sometió a extracción mediante energía de microondas. Tras esta etapa, se dejaron enfriar las bombas utilizadas a temperatura ambiente, se filtró la fase líquida a través de filtros Whatman nº 40 y se analizó una alícuota de la misma por inyección directa en HPLC-UV con red de diodos.

### *Diseño Plackett-Burman*

Inicialmente se establecieron 6 variables que podrían afectar potencialmente a la eficiencia de la extracción: cantidad de muestra, tipo de disolvente (diclorometano o acetonitrilo), volumen de disolvente,

tiempo de extracción, tiempo de calentamiento y temperatura de extracción.

Se seleccionaron acetonitrilo y diclorometano como disolventes de extracción ya que ambos se utilizan en diferentes trabajos en la extracción de antioxidantes a partir de poliolefinas mediante Soxhlet, baño de ultrasonidos u horno de microondas [Haney y Dark, 1980; El Mansouri y col., 1998; Marque y col., 1998; Nielson, 1991, 1993; Molander y col., 1999]. Además, el uso de diclorometano tiene la ventaja de evitar la oxidación del Irgafos 168 durante el procedimiento analítico [El Mansouri y col., 1998]. Las diferentes mezclas de estos disolventes se expresaron como porcentaje de diclorometano. Para determinar el intervalo de volumen de disolvente a estudiar se consideró el volumen mínimo necesario para humedecer cada muestra y el volumen máximo de extracción de los vasos utilizados en el horno de microondas. El efecto de la temperatura de extracción se estudió en el rango entre temperatura ambiente y 50°C, que es la temperatura más elevada que permite evitar la posible degradación del éster fosfito, Irgafos 168 [Nielson, 1991].

Se eligió un diseño factorial Plackett-Burman  $2^{6-3}/16$  con resolución III para discriminar la influencia relativa de los factores seleccionados. En la tabla II se muestran los valores correspondientes a los niveles superior (+) e inferior (-) elegidos para cada variable. Los experimentos se llevaron a cabo con 2 réplicas por experimento elemental considerando para cada experimento elemental la media de ambos resultados. Para estos experimentos se utilizó la muestra de film B.

Para realizar el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows V. 4.0. En la figura 4 se muestran las cartas de Pareto de efectos principales ( $P = 95\%$ ). El signo de los efectos principales muestra si la respuesta mejora (+) o empeora (-)

cuando el valor de la variable correspondiente se incrementa desde el nivel inferior al superior.

Tabla II. Factores y niveles utilizados en los diseños de experimentos.

Factores a optimizar (unidades)			Factores fijados	
Diseño I				
Plackett-Burman 2^6* 3/16	(-)	(+)		
Tiempo de extracción (minutos)	10	60		
Volumen (mL)	10	30		
Temperatura de extracción (°C)	25	50		
Cantidad de muestra (g)	0,5	2,0		
Tiempo de calentamiento (minutos)	2	10		
Mezcla disolvente (% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) *	0	100		
Diseño II				
Primer diseño compuesto central 2^3+star	(-)	(+)		
Tiempo de extracción (minutos)	10	60	Volumen (mL)	30
Temperatura de extracción (°C)	25	50	Cantidad de muestra (g)	2,0
Mezcla disolvente (% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) *	0	100	Tiempo de calentamiento (min)	2
Diseño III				
Segundo diseño compuesto central 2^3+star	(-)	(+)		
Tiempo de extracción (minutos)	10	60	Volumen (mL)	30
Temperatura de extracción (°C)	25	50	Cantidad de muestra (g)	2,0
			Tiempo calentamiento (min)	2
			Mezcla disolvente (% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	100

\* Se utilizó una mezcla de diclorometano y acetonitrilo, expresada como % de diclorometano



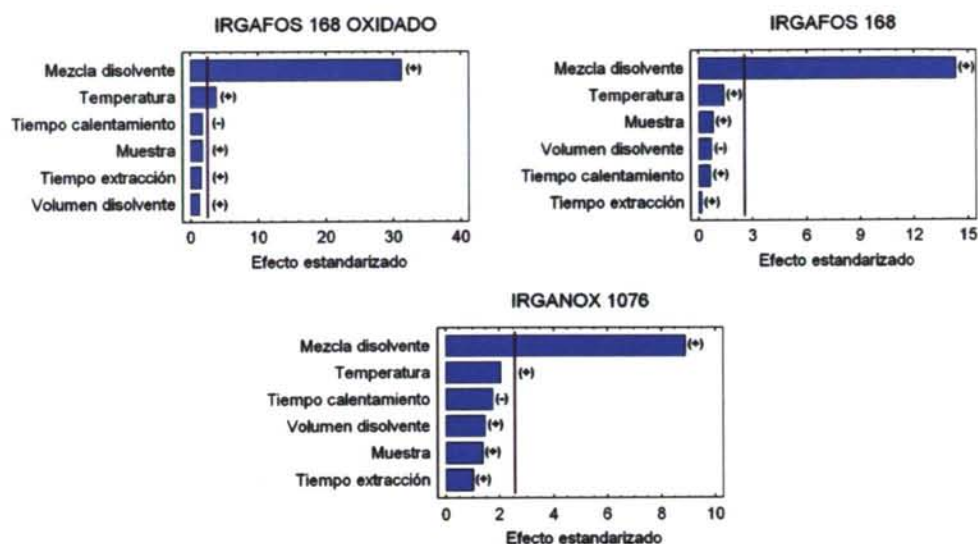


Figura 4. Cartas de Pareto para los efectos estandarizados en el diseño Plackett-Burman. Las líneas verticales definen el intervalo de confianza del 95%.

Observando los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El factor que tiene más influencia en la extracción de antioxidantes a partir de PEBD es la mezcla de disolvente utilizada, siendo estadísticamente significativo para los tres compuestos estudiados. Para todos ellos, el diclorometano permitió obtener recuperaciones más altas que el acetonitrilo (signo positivo).
- La temperatura de extracción fue estadísticamente significativa para extraer el compuesto Irgafos 168 oxidado aunque no para los demás compuestos. La cantidad de analito extraída se incrementó al aumentar la temperatura de extracción (signo positivo).

Si se descarta el efecto de las variables menos significativas y se evalúa de nuevo el efecto de las tres variables más significativas y sus correspondientes interacciones se obtienen las cartas de Pareto de la figura 5.



Observando los resultados obtenidos, representados en la figura 5, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

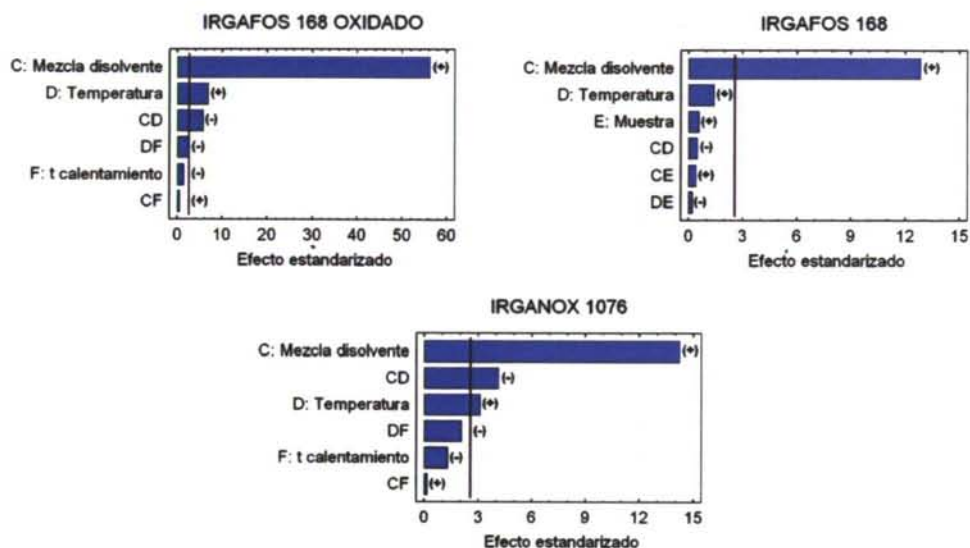


Figura 5. Cartas de Pareto de los efectos de segundo orden en el diseño Plackett-Burman.

- El disolvente aparece de nuevo como el factor más importante en la extracción de los analitos, también con signo positivo.
- La temperatura de extracción es estadísticamente significativa para el Irgafos 168 oxidado y el Irganox 1076, con signo positivo, de igual manera que cuando se consideraban los efectos principales sin tener en cuenta las interacciones.
- La interacción temperatura/disolvente es estadísticamente significativa para el Irgafos 168 oxidado y el Irganox 1076. Las figuras de interacción (figura 6) muestran que para una extracción con acetonitrilo, la cantidad de antioxidante extraída aumenta al incrementarse la temperatura mientras que cuando se utiliza diclorometano, las recuperaciones obtenidas al variar la temperatura son similares.

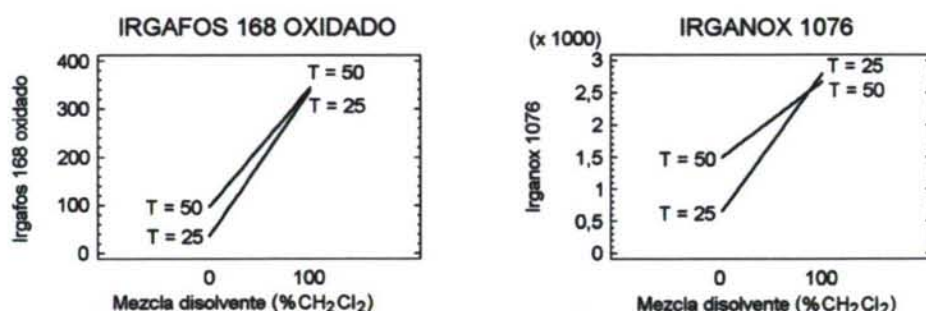


Figura 6. Gráfico de efectos de interacción entre la mezcla de disolventes y la temperatura de extracción (°C) en el diseño Plackett-Burman.

- La interacción temperatura de extracción/tiempo de calentamiento está en el límite de resultar estadísticamente significativa para el Irgafos 168 oxidado. En el gráfico de interacción (figura 7) se observa que los mejores resultados se obtienen para una temperatura de extracción alta con un tiempo de calentamiento corto por lo que decidió fijarse esta variable en el valor inferior, dos minutos para llevar a cabo los siguientes ensayos.

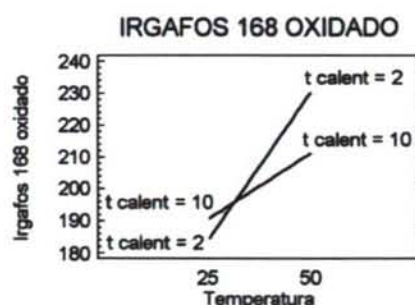


Figura 7. Gráfico de efectos de interacción entre el tiempo de calentamiento (minutos) y la temperatura de extracción (°C) en el diseño Plackett-Burman.

- Las restantes variables, cantidad de muestra y volumen de disolvente no resultaron estadísticamente significativas para ningún antioxidante. La selección del valor adecuado se realizó de acuerdo con el signo del

efecto estimado asociado a él (positivo para la mayoría de los casos), de manera que se fijaron 2 g de muestra y 30 mL de volumen de extracción

Aunque el tiempo de extracción no resultó estadísticamente significativo en este primer diseño, debido a su importancia, se optimizó el conjunto de las tres variables, temperatura, composición del disolvente y tiempo de extracción mediante el uso de un diseño compuesto central.

#### *Primer diseño compuesto central*

La tabla II (página 228) muestra los niveles que se seleccionaron para cada variable en el primer diseño compuesto central rotatable  $2^{3+}$  con 16 experimentos elementales randomizados y la tabla III las condiciones experimentales junto con la media de los resultados obtenidos. Para realizar todos estos ensayos se utilizó de nuevo la muestra B.

Si se ajustan los datos experimentales a una función polinómica de segundo orden, las superficies de respuesta (figura 8) muestran que las mezclas de disolvente con mayor porcentaje en diclorometano permiten obtener los mejores resultados para todos los compuestos.

- Sería recomendable una temperatura de extracción de 58,5 °C (el valor más alto usado en el diseño) para el Irgafos 168 oxidado, 51 °C para el Irgafos 168 y 39 °C para el Irganox 1076.
- El tiempo de extracción está en el límite de resultar estadísticamente significativo para el Irgafos 168 oxidado siendo el valor más adecuado para este compuesto de 77 minutos (el valor más alto que toma la variable en el diseño) mientras que para el Irgafos 168 sería de 16 minutos y para Irganox 1076 el valor inferior.

Tabla III. Condiciones experimentales y cantidad de antioxidante extraído ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para el primer diseño compuesto central 2<sup>3</sup>+star a partir de la muestra B.

Nº exp.	Factores			Cantidad extraída ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	Tiempo (min.)	Mezcla disolvente (% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Temperatura (°C)	Irgafos 168 oxidado	Irganox 1076	Irgafos 168
1	60	100	25	258	485	0
2	0,0	50	37,5	128	433	0
3	60	0	50	103	388	14
4	60	100	50	236	554	42
5	35	50	58,5	211	544	56
6	10	0	25	26	150	12
7	35	0	37,5	40	243	19
8	10	0	50	44	249	17
9	35	50	37,5	147	548	53
10	10	100	25	191	591	71
11	10	100	50	199	634	83
12	60	0	25	30	199	17
13	35	50	37,5	138	552	59
14	35	50	16,5	65	402	30
15	35	100	37,5	202	610	89
16	77	50	37,5	188	574	70

\* Se utilizó una mezcla de diclorometano y acetonitrilo, expresada como % de diclorometano

De acuerdo con estos resultados está claro que la composición más adecuada para el disolvente es de 100% de diclorometano, aunque la alta influencia de esta variable en los resultados recomienda realizar un segundo diseño compuesto central con los otros factores considerados, tiempo de extracción y temperatura antes de fijar su valor final, ya que la alta influencia del disolvente podría estar enmascarando la que ejercen los otros parámetros considerados.



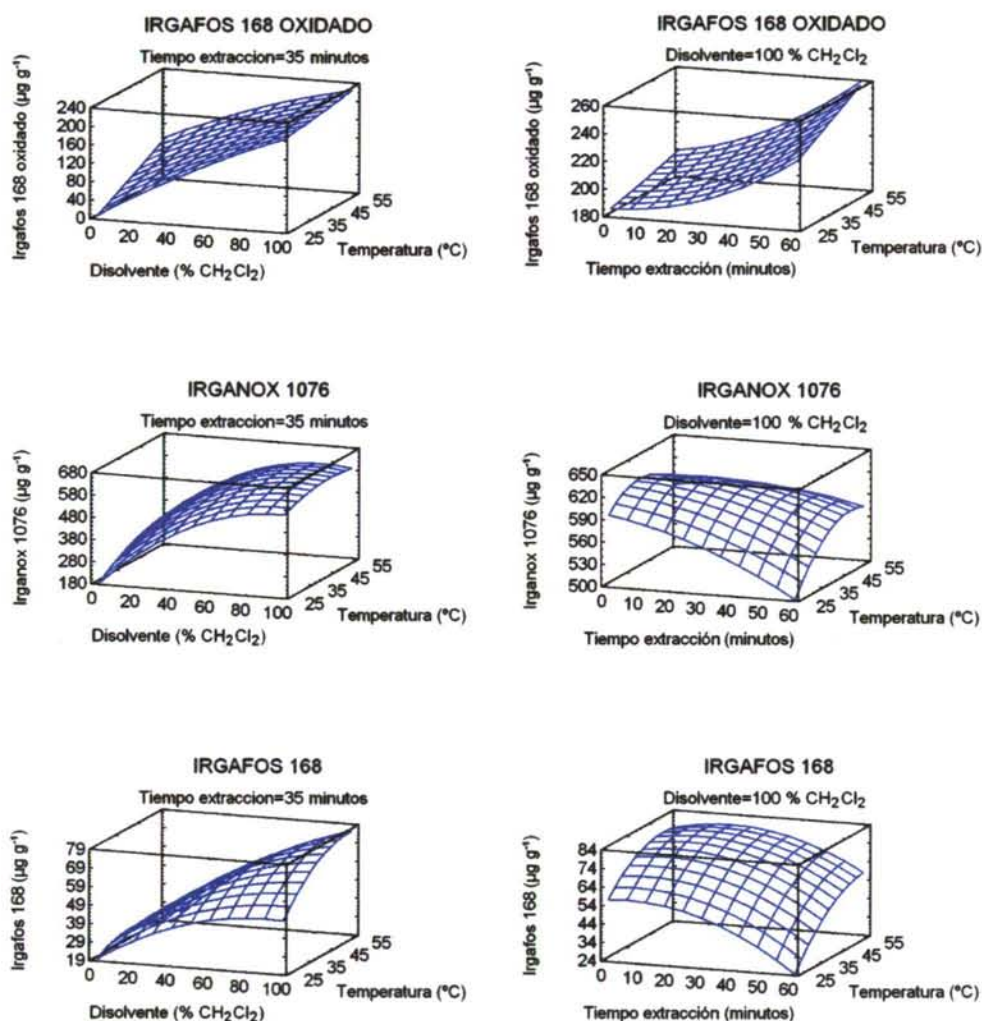


Figura 8. Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto central  $2^3+\text{star}$ .

### Segundo diseño compuesto central

Se realizó un segundo diseño compuesto central  $2^2+\text{star}$  rotatable en 10 experimentos elementales randomizados para optimizar el tiempo de extracción y la temperatura de extracción. En la tabla II (página 228) se muestran los niveles fijados para cada variable y en la tabla IV las

condiciones experimentales utilizadas así como la media de los resultados obtenidos (se realizaron 2 réplicas para cada ensayo). Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó la muestra A.

*Tabla IV. Condiciones experimentales y cantidad de antioxidante extraído ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para el segundo diseño compuesto central  $2^2$ -star a partir de la muestra A.*

Nº exp.	Factores		Cantidad extraída ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Irgafos 168 oxidado	Irganox 1076	Irgafos 168
1	37,5	31,0	389	3003	897
2	50,0	60,0	375	2977	875
3	37,5	0,0	346	2671	791
4	25,0	60,0	351	2761	798
5	25,0	2,0	354	2804	816
6	55,2	31,0	485	3770	1091
7	50,0	2,0	408	3284	950
8	37,5	31,0	378	2701	772
9	37,5	72,0	354	2725	799
10	19,8	31,0	367	2871	836

Si se ajustan los datos experimentales a una función polinómica de segundo orden, se obtiene para cada uno de los antioxidantes estudiados las superficies de respuesta de la figura 9 que no muestran ningún punto óptimo, aunque todas ellas sufren cierta curvatura de forma que los valores más altos de la temperatura de extracción permiten conseguir las mayores recuperaciones para todos los antioxidantes, por lo que se decidió fijar el valor de la temperatura de extracción en 55 °C, temperatura más alta utilizada en este modelo, ya que la naturaleza del disolvente y la estabilidad de los antioxidantes no aconsejan trabajar a valores mayores.

Por otra parte el tiempo de extracción no resultó estadísticamente significativo, presentando una influencia negativa, es decir, las mejores

recuperaciones se obtuvieron con el menor tiempo de ensayo, por lo que este se fijó en un minuto.

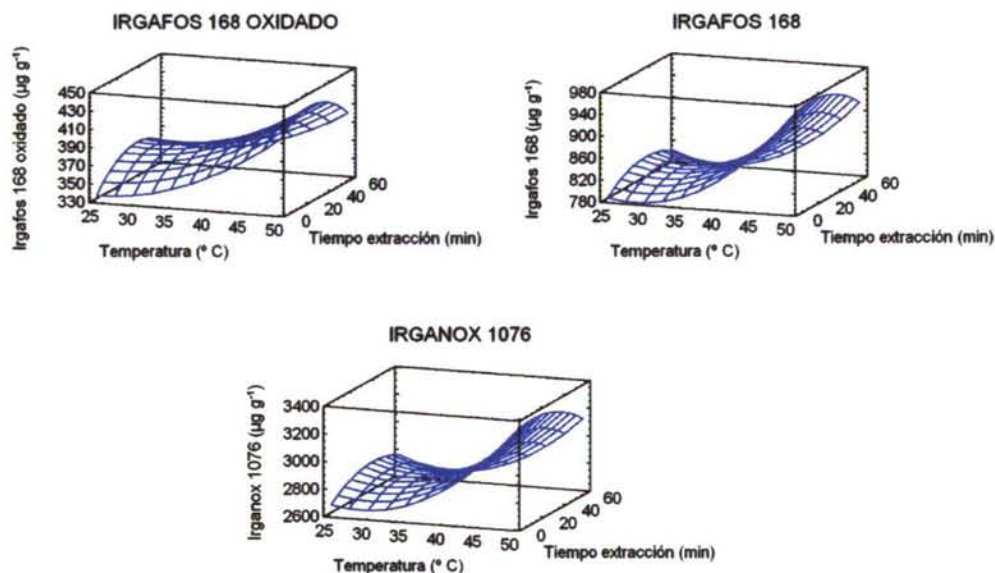


Figura 9. Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto central  $2^{2+star}$ .

### 3 CONDICIONES DE EXTRACCIÓN FINALES MEDIANTE ENERGÍA DE MICROONDAS

Tras fijar los valores óptimos para cada variable considerada en la etapa de extracción, las condiciones finales del método analítico se recogen en la tabla V.

En la figura 10 se puede ver el cromatograma obtenido para una muestra de PEBD sometida a este procedimiento analítico, tras una dilución 2:5 del extracto obtenido previa a la determinación cromatográfica.

Con el fin de comprobar que la extracción de antioxidantes a partir de la matriz, utilizando estas condiciones, fuese completa se realizaron dos extracciones consecutivas sobre la misma muestra, encontrándose en el segundo extracto en torno al 1% de la cantidad de Irgafos 168 e Irganox 1076 de la primera extracción, confirmando la validez de la metodología propuesta para la extracción de estos antioxidantes.

*Tabla V. Condiciones finales del método analítico mediante extracción con energía de microondas y determinación HPLC-UV con red de diodos.*

MUESTRA PEBD	2 g de muestra Se corta en fragmentos de aproximadamente 0,5 x 1 cm
↓	
EXTRACCIÓN MICROONDAS	Volumen diclorometano = 30 mL Tiempo de calentamiento = 2 minutos Tiempo de extracción = 1 minutos Temperatura = 55 °C
↓	
FILTRACIÓN	Filtro Whatman N° 40 Filtro HPLC 45 µm
↓	
HPLC-UV	Método puesto a punto para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos (Cap. IV) Columna Symmetry C <sub>18</sub> Elución en gradiente agua:metanol Volumen de inyección = 20 µL

Aunque el método se puso a punto utilizando una matriz de PEBD se comprobó su validez para una matriz de PP.

No se han incluido los porcentajes de recuperación de los antioxidantes extraídos a partir de las muestras de PEBD debido a que las características del proceso de extrusión no permiten conocer con certeza las concentraciones iniciales de antioxidantes en las muestras de PEBD A y B empleadas, ya que las pérdidas producidas en la extrusión del material



por degradación térmica o por la manipulación pueden afectar a los valores teóricos calculados.

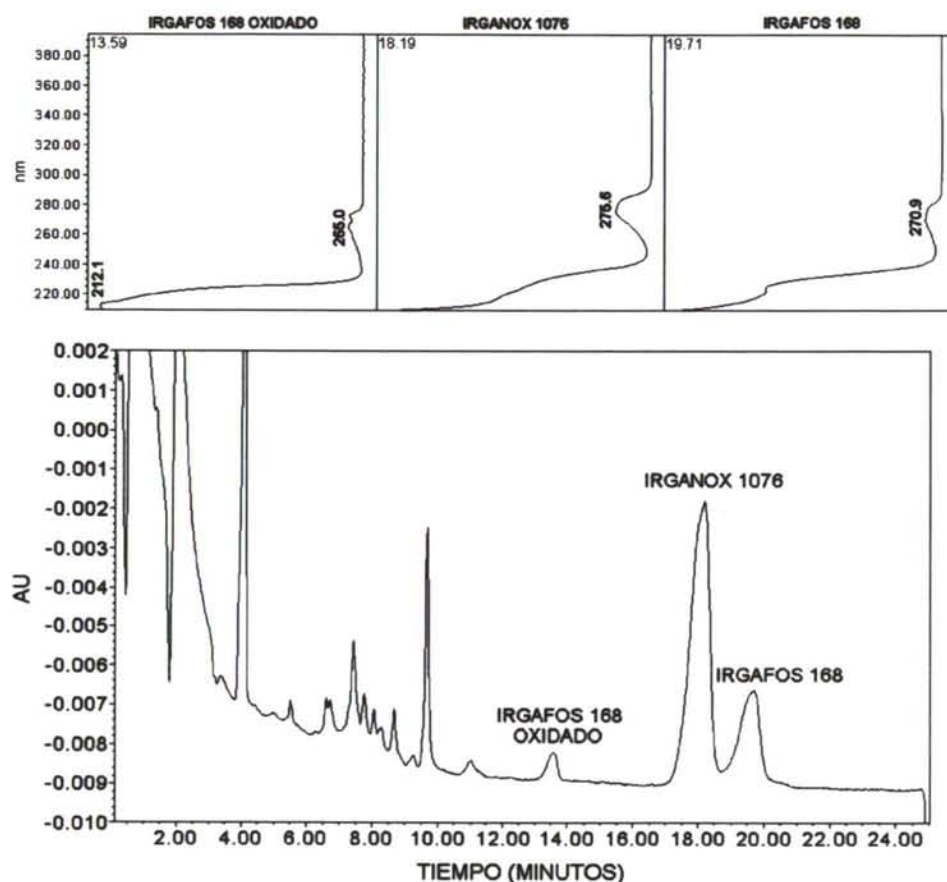


Figura 10. Cromatograma de los antioxidantes extraídos a partir de una muestra de PEBD mediante energía de microondas. La concentración de cada compuesto fue de  $6,8 \text{ mg L}^{-1}$  de Irgafos 168 oxidado,  $37 \text{ mg L}^{-1}$  de Irganox 1076 y  $9,3 \text{ mg L}^{-1}$  de Irgafos 168 tras una dilución 2:5.

#### 4 PRECISIÓN DEL MÉTODO, LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La tabla VI muestra los resultados del estudio de precisión, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) para el

método analítico completo puesto a punto incluyendo extracción, separación y cuantificación.

Tabla VI. Precisión del método analítico para 2 g de muestra A extraída con 30 mL de diclorometano y límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

	CV (%) <sup>a</sup>	CV(%) <sup>b</sup>	x LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	x LC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Irgafos 168 oxidado	5,4	9,4	14	46
Irganox 1076	5,8	6,5	7,5	25
Irgafos 168	6,1	6,5	5,1	17

<sup>a</sup> Repetibilidad para todo el método analítico (n = 5)

<sup>b</sup> Reproducibilidad para todo el método analítico (n = 3 x 5)

El método desarrollado permitió obtener valores de repetibilidad con un CV menor al 6% para todos los compuestos. El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo repitiendo 5 experimentos en 3 días diferentes [Compañó Beltrán y Ríos Castro, 2003] obteniendo valores de CV de 9,4% para Irgafos 168 oxidado y 6,5% tanto para Irgafos 168 como para Irganox 1076.

Los LD y LC se calcularon de acuerdo con Miller y Miller (2002) obteniéndose valores entre 5,1-14  $\mu\text{g g}^{-1}$  y 17-46  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, correspondiendo los resultados más altos para el Irgafos 168, que presenta los niveles de absorbancia inferiores a la longitud de onda de detección. Estos valores indican una adecuada sensibilidad del método para determinar estos analitos en film de PEBD de acuerdo con la recomendación de su uso de 1000-4000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irganox 1076 y 500-2000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irgafos 168 en poliolefinas [Ciba Specialty Chemicals].

El método analítico desarrollado permite la extracción de antioxidantes con una pequeña cantidad de disolvente (30 mL de diclorometano) y resulta más rápido que otras metodologías tradicionales como la extracción a reflujo o el uso de aparatos Soxhlet que necesita varias horas para recuperar los antioxidantes utilizando disolventes

peligrosos como cloroformo [Dilettato y Arpino, 1989; Turner, 1991; Allen y col., 1994] o grandes cantidades de disolvente, hasta 250 mL [Dilettato y Arpino., 1989; El Mansouri y col., 1998]. En comparación con otras técnicas más recientes como la extracción con baño de ultrasonidos [Marque y col., 1998; Haider y Karlsson, 1999] que se caracterizan por tiempos de extracción cortos entre 15 minutos y 1 hora, el método de microondas también presenta una mayor rapidez.

Frente a otros métodos desarrollados con extracción mediante energía de microondas que necesitan temperaturas superiores a 100 °C y tiempos de extracción mayores [Marcato y col., 2003; Molander y col., 1999], la optimización mediante diseño de experimentos ha permitido reducir el tiempo de extracción de Irganox 1076 e Irgafos 168 a sólo 3 minutos (2 minutos de tiempo de calentamiento y 1 minuto de tiempo de extracción) más 2 minutos de tiempo de enfriamiento, utilizando una temperatura bastante baja, de sólo 55 °C que evita la degradación del Irgafos 168.

Finalmente, este método permite analizar directamente mediante HPLC el extracto obtenido mediante energía de microondas sin ningún tratamiento adicional.

## **5 ESTABILIDAD DE IRGAFOS 168 EN DICLOROMETANO**

El Irgafos 168 se degrada vía oxidación y menos frecuentemente, vía hidrólisis para dar el 2, 4-di-terc-butilfenol (DBP) [Marcato y Vianello, 2000]. El Mansouri y col. (1998) estudiaron la estabilidad del fosfito en función de la polaridad del disolventes viendo que este compuesto no se degradaba cuando se utilizaban disolventes poco polares como el diclorometano y el tolueno. Teniendo en cuenta esto, se comprobó la



estabilidad del Irgafos 168 durante la aplicación del método para ser capaces de diferenciar el origen del Irgafos 168 oxidado.

Se sometió una disolución patrón individual ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) de Irgafos 168 preparada en diclorometano al proceso de extracción mediante energía de microondas. La concentración del patrón fue determinada mediante HPLC antes y después de la etapa de extracción obteniendo una recuperación tras la extracción del 98% sin detectarse ninguna señal correspondiente al Irgafos 168 oxidado en el cromatograma.

Por lo tanto, se puede considerar que el Irgafos 168 oxidado determinado en el polímero se ha producido por degradación del Irgafos 168 durante el proceso de extrusión o durante la vida de servicio del film pero que no ha sido causado por el método analítico. De esta forma, el método de extracción desarrollado tiene la ventaja de permitir llevar a cabo la determinación de ambos compuestos individuales en la matriz polimérica, Irgafos 168 y su producto oxidado.

## **6 CONCLUSIONES**

La energía de microondas resulta ser una técnica adecuada para la extracción de Irgafos 168 e Irganox 1076 a partir de la matriz de PEBD, el extracto se analiza directamente mediante HPLC sin ningún paso de concentración previo.

Se identifica como la variable más influyente en el método de extracción desarrollado el tipo de disolvente, el uso de 100% de diclorometano permitió obtener los mejores resultados para todos los analitos considerados.



Las condiciones optimizadas fijadas con el método de extracción de acuerdo con el diseño de experimentos utilizado permitieron la extracción de los antioxidantes con buena precisión (repetibilidad con CV en torno a 6% para todos los analitos y reproducibilidad con CV de 9,4% para Irgafos 168 oxidado y 6,5% para Irganox 1076 e Irgafos 168) con un tiempo de extracción muy corto.

Los límites de cuantificación del método, en el rango 17-46  $\mu\text{g g}^{-1}$  son bastante inferiores a los niveles de concentración que podrían ser encontrados en la matriz de PEBD de acuerdo con cantidades de uso recomendadas a nivel industrial por lo que no se considera oportuno introducir una etapa de preconcentración.

La estabilidad del fosfito Irgafos 168, que no se oxida durante la aplicación del método analítico, permite diferenciar la cantidad de Irgafos 168 que permanece sin reaccionar en el film y la cantidad de Irgafos 168 oxidado formado durante el procesado térmico o su tiempo de servicio, lo que puede resultar de utilidad para controlar la calidad del film.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, D.W.; Clench, M.R.; Crowson, A.; Lethard, D.A. y Saklatvala, R. (1994) Characterisation of electron beam generated transformation products of Irganox 1010 by particle beam liquid chromatography-mass spectrometry with on-line diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 679, 285-297.

Ashraf-Khorassani, M.; Nazem, N. y Taylor, L.T. (2003) Feasibility of supercritical fluid extraction with on-line coupling of reversed-phase liquid

chromatography for quantitative analysis of polymer additives. Short communication. *Journal of Chromatography A*, 995, 227-232.

Baylocq, D.; Majcherczyk, C. y Pellerin, F. (1985) Detection et dosage des antioxydants dans les matieres plastiques a base de polyolefines. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 43, 329-335.

Catalá, R. y Gavara, R. (2002) "Fundamentos y mecanismos de los fenómenos de migración" en Catalá, R. y Gavara, R. "Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos". *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. I, p. 1-17.

Ciba Specialty Chemicals <http://www.cibasc.com/>

Compañó Beltrán, R. y Ríos Castro, A. (2003) Garantía de calidad en los laboratorios analíticos. *Ed. Síntesis*, Madrid, España. Capítulo 11. Selección y validación de los métodos analíticos, p. 211-245.

Di Pasquale, G. y Galli, M.J. (1984) Determination of additives in poliolefins by capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 7, 484-486.

Dilettato, D. y Arpino, P.J. (1989) Analysis of polymer additives in plastics for food packaging: comparison of the performances of high performance chromatography and capillary supercritical fluid chromatography. *Agriculture, food chemistry and the consumer: Proceedings of the fifth European conference on Food Chemistry*, Vol. 1, 73-77.

El Mansouri, H.; Yagoubi, N. y Ferrier, D. (1998) Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. *Chromatographia*, 48 (7/8) 491 - 496.

Freitag, W. y John, O. (1990) Fast separation of stabilizers from polyolefins by microwave heating. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 175, (2952) 181-185.

Garde, J.A. Catalá, R. y Gavara, R. (1998) Analysis of antioxidants extracted from polypropylene by supercritical fluid extraction. *Food Additives and Contaminants*, 15 (6), 701-708.

Haider, N. y Karlsson, S. (1999) A rapid ultrasonic extraction technique to identify and quantify additives in poly(ethylene). *Analyst*, 124, 797-800.

Haider, N. y Karlsson, S. (2002) Loss and transformation products of the aromatic antioxidants in MDPE film under long-term exposure to biotic and abiotic conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 85, 974 - 988.

Haney, M.A. y Dark, W.A (1980) A reversed-phase high pressure liquid chromatographic method for analysis of additives in polyolefins. *Journal of Chromatographic Science*, 18, 655-659.

Marcato, B. y Vianello, M. (2000) Microwave-assisted extraction by gast sample preparation for the systematic analysis of additives in polyolefins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 869, 285 - 300.

Marcato, B.; Guerra, S.; Vianello, M. y Scalia, S. (2003) Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 217-225.

Marque, D.; Feigenbaum, A.; Dainelli, D. y Riquet, A-M. (1998) Safety evaluation of an ionized multilayer plastic film used for vacuum cooking and meat preservation. *Food Additives and Contaminants*, 15 (7), 831-841.



Miller, J.N. y Miller, J.C. (2002) Estadística y quimiometría para química analítica. 4º edición, *Pearson educación*, Madrid. Cap. 5. Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación, p. 111-155.

Molander, P.; Haugland, K.; Hegna, D.R.; Ommundsen, E. Lundanes, E. y Greibrokk, T. (1999) Determination of low levels of an antioxidant in polyolefins by large-volume injection temperature-programmed packed capillary liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, 864, 103-109.

Nielson, R.C. (1991) Extraction and quantitation of polyolefin additives. *Journal of Liquid Chromatography*, 14, 503-519.

Nielson, R.C. (1993) Recent advances in polyolefin additives analysis. *Journal of Liquid Chromatography*, 16 (7), 1625-1638.

Pinto, A.M. y Taylor, L.T. (1998) Evolution of a method for quantitative supercritical fluid extraction of Ethanox 330 antioxidant from high-density polyethylene. *Journal of Chromatography A*, 811, 163-170.

Salafranca, J. Cacho, J. y Nerín, C. (1999) Supercritical fluid extraction (SFE) optimization by full-factorial design for the determination of Irganox 1076, Irgafos 168 and Chimassorb 81 in virgin and recycled polyolefins. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22, 553-558.

Thilén, M. y Shishoo, R. (2000) Optimization of experimental parameters for the quantification of polymer additives using SFE/HPLC. *Journal of Applied Polymer Science*, 76, 938 - 946.

Turner, B.E. (1991) Analysis of polymers and polymers additives using an evaporative light-scattering detector. *LC-GC International*, 4, 22-25.



Vadakkoot, C.F; Yoginder, N.S. e Ishwar, S.B. (1983) Quantitative determination of antioxidants and ultraviolet stabilizers in polymers by high performance liquid chromatography. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 113, 219-225.

Vandenburg, H.J. Clifford, A.A.; Bartle, K.D; Zhu S.A.; Carroll, J.; Newton, I.D. y Garden, L.M (1998) Factors affecting high-pressure solvent extraction (accelerated solvent extraction) of additives from polymers. *Analytical Chemistry*, 70, 1943-1948.

Zhou, L.Y.; Ashraf-Khorassani, M. y Taylor, L.T. (1999) Comparison of methods for quantitative analysis of additives in low-density polyethylene using supercritical fluid and enhanced solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 858, 209-218.

**Capítulo VII**  
***Estudio de la estabilidad de los***  
***antioxidantes en los simulantes A, B, C y D***

## Capítulo VII. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes A, B, C y D

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>251</b>
1.1	Objetivo .....	253
1.2	Material y equipos.....	253
1.3	Reactivos .....	254
<b>2</b>	<b>Ensayos preliminares del estudio de estabilidad .....</b>	<b>255</b>
<b>3</b>	<b>Procedimiento experimental .....</b>	<b>256</b>
3.1	Preparación de disoluciones patrón .....	256
3.2	Condiciones cromatográficas .....	256
3.3	Condiciones de los ensayos de estabilidad .....	257
3.4	Preparación de muestras de simulante sobrecargadas individualmente con los antioxidantes .....	257
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>259</b>
4.1	Resultados obtenidos considerando temperatura y simulante .....	260
4.2	Discusión de los resultados .....	267
4.3	Degradación del Ethanox 330 .....	269
<b>5</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>273</b>
<b>6</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>274</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Durante los ensayos de migración específica se pone en contacto el material plástico con el simulante de alimentos bajo determinadas condiciones de tiempo y temperatura para posteriormente determinar el nivel de migración específica del antioxidante en el simulante. Sin embargo, hay que considerar que este valor no será representativo del nivel de migración real a partir del embalaje si el analito no resulta estable en el simulante durante el ensayo de migración, por lo que se considera interesante llevar a cabo un estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes en condiciones similares a las utilizadas durante los ensayos de migración, con el fin de conocer qué analitos se podrían ver afectados por la exposición al calor en cada simulante en el transcurso del tiempo.

Mientras que se ha llevado a cabo un número considerable de investigaciones centradas en el estudio de la estabilidad de los plásticos durante el procesado, apenas existen estudios sobre la estabilidad de los aditivos en los simulantes de alimentos [Demertzis y Franz, 1998; Quinto-Fernández y col., 2003]. No existe mucha información ni sobre los tipos de aditivos que pueden sufrir degradación en los simulantes de alimentos ni sobre sus productos de degradación, o el tipo de medio o exposición al calor a los que resultan más sensibles [Simoneau y Hannaert, 1999].

En la tabla I se incluye una breve descripción de los trabajos que se han encontrado, que estudian la estabilidad de diferentes aditivos en simulantes de alimentos bajo las condiciones de tiempo y temperatura características de los ensayos de migración.

En estos trabajos consultados los ensayos de estabilidad se llevaron a cabo sobrecargando los simulantes con los aditivos estudiados a concentraciones en torno a su LME para posteriormente someter estas disoluciones a las condiciones de tiempo y temperatura establecidas por la



legislación para los ensayos de migración. Las muestras de simulante se analizaron al final del ensayo comparándolas con muestras frescas de simulante sobrecargado con la misma concentración de aditivo. Sin embargo, no se considera válido corregir directamente los resultados de migración aplicando las recuperaciones obtenidas en los experimentos de estabilidad [Cooper y col., 1998] porque en el ensayo de migración el aditivo difunde gradualmente en el simulante durante toda la exposición mientras que en el ensayo de estabilidad el aditivo se está exponiendo al simulante durante el tiempo total.

*Tabla I. Bibliografía revisada que determina la estabilidad de diferentes aditivos en simulantes de alimentos bajo las condiciones de los ensayos de migración.*

Autor	Analitos	Simulante
Schwope y col. (1987a)	Antioxidantes: BHT, Irganox 1010	Simulante acuoso: Etanol al 8% y 50 %.
Schwope y col. (1987b)	Antioxidantes: Irganox 1010	Simulante acuoso: Etanol al 8% y 50 %.
O'Brien y col. (1997)	Agente antiestático: BEA Plastificante: DEHA Antioxidante: Irganox 1076	Simulante graso: aceite de oliva.
Cooper y col. (1998)	Antioxidante: Irganox 1076 Plastificante: DEHA	Simulante graso: isooctano y etanol al 95%.
Demertzis y Franz (1998)	Antioxidantes Irganox 3114, Irganox 1035, Irganox 245, Irganox 1098 e Irgafos P-EPQ	Simulante graso: aceite de oliva e isooctano.
Pérez Lamela y col., (1998)	Antioxidante fosfito Ultrinox 626	Simulantes acuosos: agua destilada, ácido acético al 3% y etanol al 15%. Simulante graso: etanol al 95%, isooctano.
Quinto-Fernández y col. (2003)	Antioxidantes: Irganox 245 e Irganox 1035 Absorbedor UV: Chimsasorb 81 Agente óptico: Uvitex OB	Simulante graso: aceite de oliva.

## 1.1 Objetivo

Teniendo en cuenta que en los ensayos de migración la difusión de las moléculas de aditivos se produce de forma gradual en el simulante durante toda el tiempo de exposición, las moléculas del antioxidante que migran van a estar presentes en el simulante de alimentos durante diferentes períodos de tiempo. Por lo tanto, en este trabajo se ha planteado realizar un estudio de la estabilidad de los antioxidantes en los simulantes de alimentos que permita conocer el perfil de su degradación bajo los efectos de la temperatura a diferentes tiempos, en lugar de realizar la medida de su recuperación únicamente al final del ensayo.

## 1.2 Material y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters (Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.
  - Sistema de mezcla a baja presión.
  - Sistema de desgasificación al vacío en línea de cuatro canales.
  - Inyector automático.
- Detector UV con red de diodos Waters (Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Sistema de recogida y procesado de datos Millenium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,0 x 150 mm empacada con relleno Symmetry C<sub>18</sub>, 3,5 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).

### 1.3 Reactivos

- Metanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Etanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tetrahidrofurano para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford MA, USA).
- Ácido acético glacial para HPLC (Panreac Quimica, Barcelona, España).
- Aceite de oliva Carbonell con acidez máxima de 0,4°.
- Antioxidantes:
  - 2,2'-metilenbis(4-metil-6-terc-butifenol) (AO 2246) CAS N° [119-47-1]; 2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butilfenol) (AO 425) CAS N° [88-24-4]; BHA, mezcla de isómeros 2[3]-t-butil-4-hidroxianisol; 2[3]-t-butilhidroquinona monometil éter, mínimo 90% isómero-3 /9%- isómero-2-) CAS N° [25013-16-5]; 2, 6 di-terc-butil-p-cresol (BHT, 99%) CAS N° [128-37-0] y 1,3,5-trimetil-2,4,6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno (Ethanox 330, 99%) CAS N° [1709-70-2] de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
  - 2,4-di-terc-butil-fenol (DBP, ≥98%) CAS N° [96-76-4] de Fluka (Buchs, Suiza).
  - Fosfito de tris(2, 4-di-terc-butilfenilo) (Irgafos 168) CAS N° [31570-04-4]; tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol (Irganox 1010) CAS N° [6683-19-8] y 3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-propionato de octadecilo (Irganox 1076) CAS [2082-79-3] de Ciba (Basel, Suiza).



## **2 ENSAYOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD**

Se realizaron unos primeros ensayos para estudiar la estabilidad de los antioxidantes BHA, DBP, BHT, Irganox 1010, E330, Irgafos 168 e Irganox 1076 en los simulantes acuosos en los que se prepararon disoluciones mezcla de todos estos compuestos en los tres simulantes acuosos, A, B y C a dos concentraciones de trabajo, 5 mg L<sup>-1</sup> y 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Las muestras de simulante sobrecargado a 5 mg L<sup>-1</sup> se analizaron directamente mediante HPLC-UV con red de diodos con el método descrito en el capítulo IV para la determinación de antioxidantes en simulantes acuosos mientras que las de 0,5 mg L<sup>-1</sup> se preconcentraron previamente mediante el proceso de SPE descrito en la tabla X del capítulo V.

Teniendo en cuenta su uso habitual durante los ensayos de migración, se seleccionaron una temperatura de 40 °C y un tiempo de 10 días como condiciones para los ensayos de estabilidad, período durante el cual se analizaron muestras a tiempos de 0, 3, 6 y 10 días. Los resultados obtenidos mostraron la imposibilidad de realizar los ensayos de estabilidad de forma conjunta para todos los compuestos debido a la coelución de los antioxidantes con algunos nuevos picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación que se formaron durante el ensayo. Teniendo en cuenta que la identificación de estos nuevos compuestos prolongaría considerablemente el estudio, se decidió realizar los ensayos de estabilidad para disoluciones de cada antioxidante preparados de forma individual con el fin de estudiar la desaparición del antioxidante durante el experimento, evitando así que el producto de degradación de un antioxidante pueda interferir en la señal de otro.



### **3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Preparación de disoluciones patrón**

Se prepararon disoluciones individuales patrón de cada antioxidante en todos los simulantes acuosos (A, B y C) y en aceite de oliva a concentraciones en torno a su nivel de LME que se sometieron a diferentes temperaturas (5, 40 y 70 °C) durante un intervalo de 20 días. Periódicamente, las disoluciones se analizaron mediante HPLC-UV con red de diodos para determinar el porcentaje de cada antioxidante que permanece estable en el tiempo.

Se determinó la estabilidad de los dos productos de degradación del Irgafos 168, su producto de oxidación (fosfato de tris [2,4-di-terc-butilfenilo) y su producto de hidrólisis (DBP), pero no del antioxidante fosfito directamente, debido a que la metodología analítica empleada no garantizaría que el compuesto no se estuviese degradando durante su análisis. En los simulantes acuosos no se pudo encontrar ningún disolvente en el que la disolución patrón de este compuesto se mantuviese estable y al mismo tiempo fuese miscible con el agua. En el caso del simulante D, el método de análisis empleado para determinar la estabilidad de los antioxidantes causa por sí mismo la oxidación del fosfito debido a la presencia de THF [Garde y col., 2001].

#### **3.2 Condiciones cromatográficas**

Para determinar los antioxidantes en los simulante A, B y C se utilizó el método cromatográfico de determinación de antioxidantes en simulantes acuosos descrito en el capítulo IV, tabla IV. Para llevar a cabo la determinación en aceite de oliva fue necesario utilizar el método descrito en el capítulo IV, tabla IX, para la determinación de antioxidantes en simulante D.

En simulante acuoso los analitos se analizaron directamente, mientras que el simulante graso se diluyó con THF antes de su análisis cromatográfico de manera que  $2 \pm 0,01$  g de muestra de aceite de oliva sobrecargada se diluyó hasta un volumen final de 5 mL con THF.

Cada compuesto se identificó por comparación de su tiempo de retención con el tiempo correspondiente al pico de la disolución patrón y por su espectro UV. La cuantificación se llevó a cabo utilizando una recta de calibrado de patrón externo con patrones diluidos en acetonitrilo. En el ensayo de estabilidad en el simulante D algunos antioxidantes coeluyeron con pequeños picos cromatográficos correspondientes al aceite de oliva, por lo que se corrigió la respuesta del antioxidante restándole el área correspondiente al blanco del aceite de oliva.

### **3.3 Condiciones de los ensayos de estabilidad**

Los ensayos se llevaron a cabo a 5, 40 y 70 °C de acuerdo con la Directiva 82/711/CEE que fija las condiciones de temperatura de los ensayos de migración dependiendo de la temperatura de contacto durante el uso (tabla II). Teniendo en cuenta que la citada Directiva marca como tiempo más largo para los ensayos de migración de 10 días, se realizaron varias determinaciones secuenciales de la estabilidad del antioxidante durante los primeros diez días de ensayo, y una determinación final a 20 días.

### **3.4 Preparación de muestras de simulante sobrecargadas individualmente con los antioxidantes**

La Directiva 2002/72/CE establece LME para cinco de los antioxidantes estudiados (tabla VI del capítulo I), que se tomaron como referencia para fijar la concentración a la que se realizaron los ensayos de estabilidad, de forma que se seleccionaron dos concentraciones de trabajo:

1,5 mg Kg<sup>-1</sup> para AO 2246 y AO 425 y 5 mg Kg<sup>-1</sup> para los restantes antioxidantes.

Tabla II. Condiciones de tiempo y temperatura para los ensayos de migración [Directiva 82/711/CEE].

CONDICIONES DE CONTACTO EN LAS PEORES CONDICIONES DE USO PREVISIBLES	CONDICIONES DE ENSAYO
Duración del contacto	Duración del ensayo
t > 24 horas	10 días
Temperatura de contacto	Temperatura del ensayo
T ≤ 5 °C	5 °C
20 °C < T ≤ 40 °C	40 °C
40 °C < T ≤ 70 °C	70 °C

*Ensayos de estabilidad en simulantes acuosos:* se prepararon disoluciones patrón individuales de los antioxidantes (1000 mg L<sup>-1</sup>) en acetonitrilo para BHA, DBP, BHT e Irganox 1010, en una mezcla de metanol: tetrahidrofurano (75:25) para Ethanox 330 y en tetrahidrofurano para Irganox 1076 e Irgafos 168. Estas disoluciones patrón se diluyeron con acetonitrilo para obtener las disoluciones individuales de trabajo de 100 mg L<sup>-1</sup>. Finalmente, las disoluciones de 100 mg L<sup>-1</sup> se utilizaron para sobrecargar las disoluciones individuales de 10 mL de simulante acuoso (agua destilada, ácido acético al 3% y etanol al 10%) hasta una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> para todos los antioxidantes excepto para AO 2246 y AO425 que se prepararon a 1,5 mg L<sup>-1</sup>. Con este procedimiento se aseguró la disolución de todos los antioxidantes con baja solubilidad en los simulantes acuosos a temperatura ambiente.

*Ensayos de estabilidad en aceite de oliva:* para AO 2246 y AO 425 se prepararon disoluciones individuales de 25 g de aceite de oliva sobrecargado a una concentración de 1,5 mg Kg<sup>-1</sup> usando disoluciones patrón individuales de 250 mg L<sup>-1</sup> preparadas en THF. Para los antioxidantes



BHA, BHT, DBP, Irgafos 168 oxidado e Irganox 1010 se prepararon disoluciones individuales de 25 g de aceite de oliva sobrecargadas a una concentración de 5 mg Kg<sup>-1</sup> utilizando disoluciones patrón de 1000 mg L<sup>-1</sup> de los antioxidantes preparadas en THF. La estabilidad del Irganox 1076 no se pudo determinar en aceite de oliva ya que el método analítico no resultó adecuado. Junto con las disoluciones de antioxidantes en aceite de oliva se sometió un blanco de aceite de oliva a las mismas condiciones de tiempo y temperatura de los ensayos de estabilidad con el fin de corregir la señal cromatográfica de los antioxidantes, lo que resultó necesario ya que se observó que la señal del blanco de aceite de oliva cambiaba en función del tiempo y la temperatura.

Se prepararon una serie de disoluciones individuales de antioxidantes en cada simulante para cada temperatura estudiada en los ensayos de estabilidad, 5, 40 y 70 °C, hasta un total de 105 disoluciones. Estas disoluciones se guardaron en viales de vidrio transparentes y se almacenaron durante 20 días en las condiciones del ensayo de migración. A intervalos de tiempo fijados se analizaron alícuotas de cada disolución mediante HPLC.

## **4 RESULTADOS**

Las figuras 1, 2, y 3 muestran los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad para cada antioxidante en los simulantes A, B, C y D durante un intervalo de tiempo de 20 días a 5, 40 y 70 °C, respectivamente.

El porcentaje de recuperación de cada antioxidante se calcula como la relación entre la concentración de cada antioxidante en el simulante a un tiempo determinado y la concentración de ese antioxidante al comienzo del ensayo (tiempo = 0). Se ha considerado que aquella sustancia que



muestra una recuperación en el simulante inferior al 50% respecto a la cantidad inicial añadida no es estable en el correspondiente simulante a las condiciones de ensayo (tiempo y temperatura) especificadas [Pérez Lamela y col., 1998].

Para llevar a cabo el análisis de los resultados se compararon las gráficas mostradas en las figuras 1, 2 y 3.

#### **4.1 Resultados obtenidos considerando temperatura y simulante**

##### *Estabilidad a 5 °C*

Como se observa en la figura 1, los antioxidantes en general a 5 °C son estables:

- Las curvas de los compuestos en los simulantes A y C son muy similares: la mayoría de los antioxidantes parecen ser estables durante todo el ensayo sin que disminuyan sus recuperaciones, excepto para el AO 2246 y el AO 425. Estos compuestos se degradaron parcialmente durante los primeros días de ensayo aunque después sus recuperaciones se mantuvieron constantes en torno a 40-50% hasta el final del ensayo.
- En el simulante B, BHA, BHT y DBP (compuestos fenólicos de baja masa molecular) y E330 parecen ser estables durante todo el ensayo, de manera similar a su comportamiento en los simulantes A y C. Las recuperaciones de los compuestos de masa molecular media AO 2246 y AO 425 fueron disminuyendo en los primeros días de ensayo hasta niveles de 40-50% que se mantuvieron hasta el final del ensayo, de forma similar al comportamiento mostrado en los simulantes A y C. Por otra parte, los compuestos de mayor masa molecular, Irganox 1010, Irgafos 168 e Irganox 1076 resultaron inestables a los 10 días de haberse iniciado el ensayo.

- El simulante D permitió la mayor estabilidad para todos los antioxidantes a 5 °C, únicamente al final del ensayo las recuperaciones de los compuestos disminuyeron siendo el E330 inestable a 20 días con una recuperación menor que el 50%.

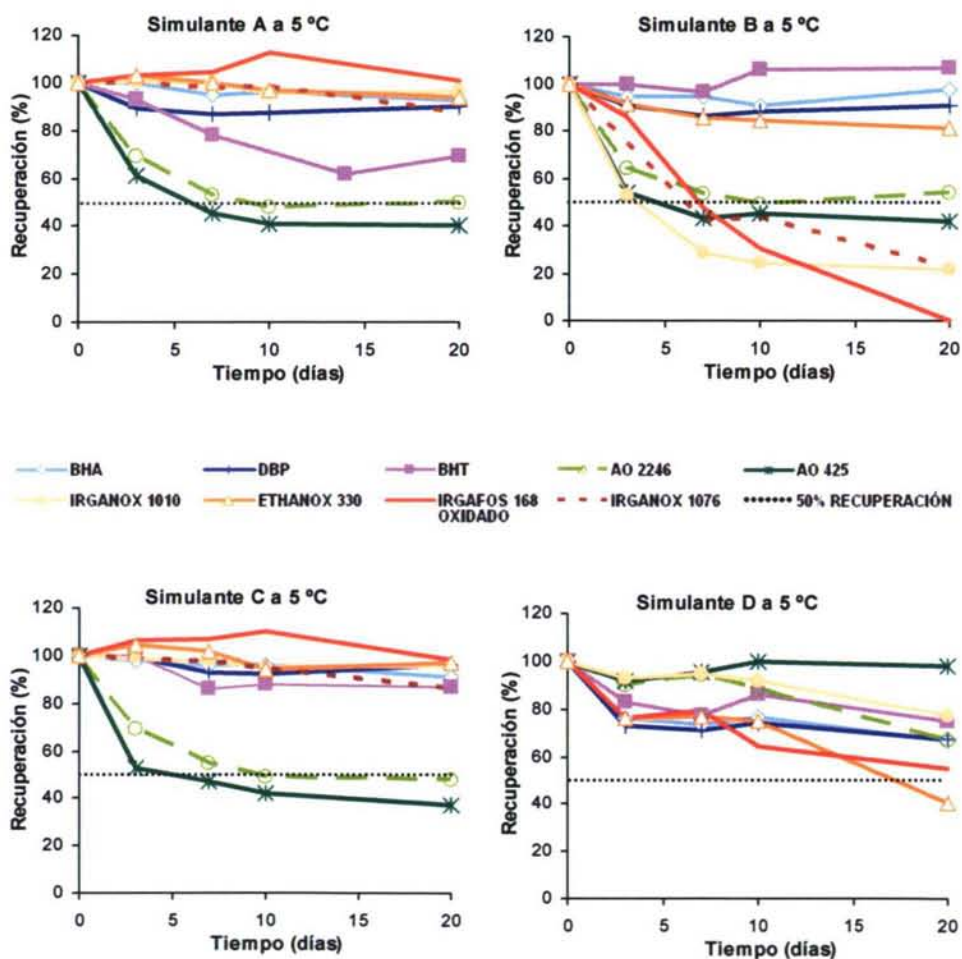


Figura 1. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 5 °C.

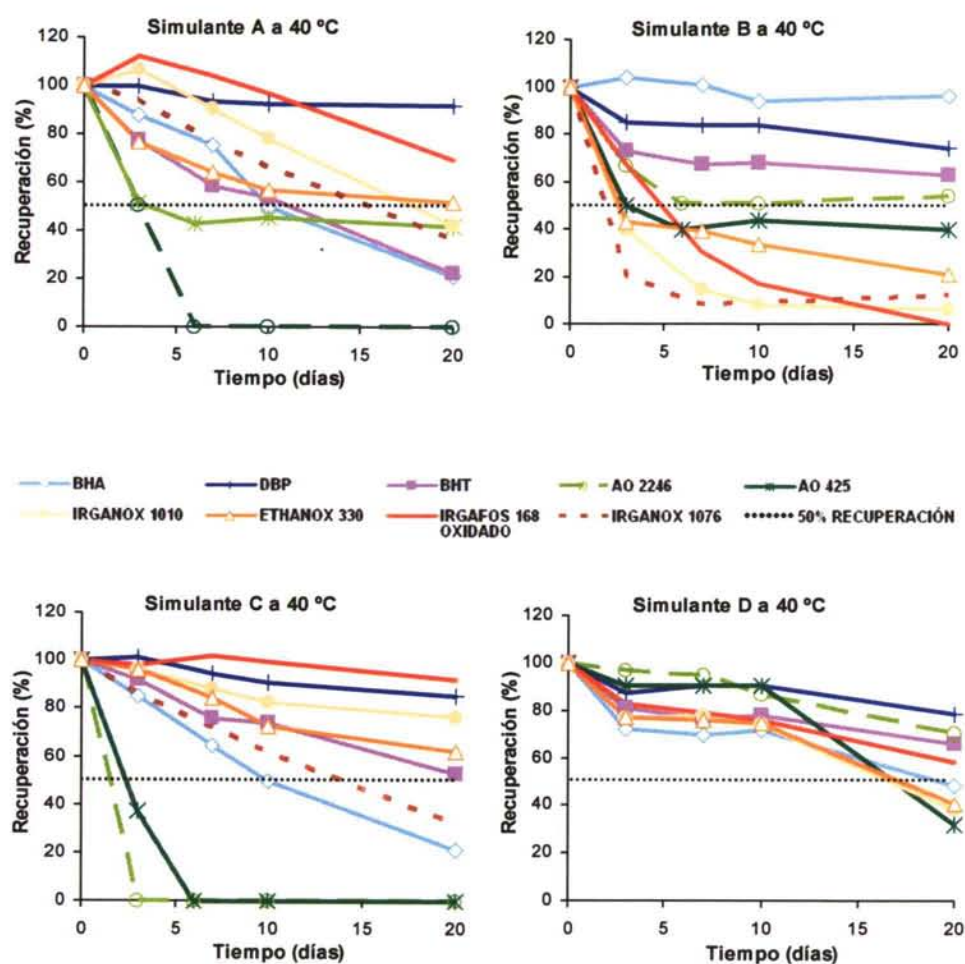


Figura 2. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 40 °C.

Estabilidad a 40 °C (figura 2):

- Simulante A: DBP e Irgafos 168 oxidado, productos de hidrólisis y oxidación del Irgafos 168 respectivamente son los compuestos más estables durante el ensayo. Con respecto al resto de los compuestos, a 10 días, el AO 2246 pierde su estabilidad mientras que AO 425, BHA, BHT y E 330 mostraron una recuperación en torno al 40-60 % e Irganox



1010 e Irganox 1076 se comportan como compuestos estables. A 20 días, BHA y BHT se manifiestan inestables, al igual que el AO 2246. E330 y AO 425 mantuvieron una recuperación en torno a 40-60% mientras que los niveles de Irganox 1010 e Irganox 1076 disminuyeron hasta estos porcentajes. Por lo tanto, en el simulante A, los antioxidantes sufrieron una descomposición rápida por incremento de la temperatura desde 5 a 40 °C. A 20 días los compuestos más estables fueron DBP e Irgafos 168, productos de degradación del Irgafos 168.

- Simulante C: a 10 días, los antioxidantes AO 2246 y AO 425 presentan inestabilidad mientras que el BHA alcanza una recuperación en torno al 50%. A 20 días, el número de compuestos inestables creció, siendo inestables el BHA y el Irganox 1076 junto con el AO 2246 y el AO 425. Además, BHT y E330 mostraron recuperaciones en torno al 50-60%. Por lo tanto, si la temperatura aumenta de 5 a 40 °C, la inestabilidad de AO 2246 y AO 425 aumenta en un corto espacio de tiempo, y este incremento de temperatura hace que BHA e Irganox 1076 se vuelvan inestables pero en un tiempo más largo.
- Simulante B: los compuestos de menor masa molecular, BHA, BHT y DBP se comportan de forma estable durante el experimento completo. Los compuestos de masa molecular media AO 2246 y AO 425 se manifestaron más estables en el simulante B que en los otros simulantes acuosos mostrando la misma curva de estabilidad que a 5 °C. Por el contrario, los compuestos de alta masa molecular, Irganox 1010, Irganox 1076, Irgafos 168 oxidado y E330 sufren degradación más rápido en el simulante B que en el A o en C y a 5 días ya no resultan estables. De esta forma, los compuestos de mayor masa molecular presentan una degradación más rápida en el simulante B a 40 °C que a 5 °C.



- Simulante D: al igual que a 5 °C fue el simulante que permitió la mayor estabilidad para todos los antioxidantes estudiados a lo largo del tiempo. Sólo al final del ensayo, a 20 días, se pudo observar que las recuperaciones habían disminuido, siendo menores al 50% para AO 425, E330 e Irganox 1010 y en torno al 50% para el BHA. Por lo tanto, el incremento de temperatura desde 5 a 40 °C afecta a la estabilidad de los antioxidantes estudiados en largos intervalos de tiempo, pero no en tiempos cortos.

*Estabilidad a 70 °C (figura 3):*

- Simulantes A y C: las curvas de los gráficos A y C son muy similares, con una degradación más rápida en ambos para la mayoría de los antioxidantes que a temperaturas inferiores. El único compuesto que continúa siendo estable tras el ensayo completo es el Irgafos 168 oxidado en el simulante C, ya que el resto de los antioxidantes muestran una recuperación muy baja desde el comienzo del ensayo en ambos casos.
- Simulante B: la estabilidad de todos los antioxidantes estudiados excepto el Irgafos 168 oxidado es mayor en el simulante B que en los demás simulantes acuosos. Los antioxidantes de menor masa molecular DBP y BHT presentan un comportamiento estable durante todo el ensayo y el BHA hasta 10 días. La estabilidad de AO 2246 y AO 425 es similar a los ensayos de baja temperatura (5 y 40 °C) en el simulante B. Una vez más, los compuestos que sufren una mayor degradación en este simulante son los antioxidantes de mayor masa molecular, E330, Irganox 1010, Irganox 1076 e Irgafos 168 oxidado como sucede a 5 y 40 °C de manera que estos compuestos son inestables desde los primeros días del ensayo a 70 °C.

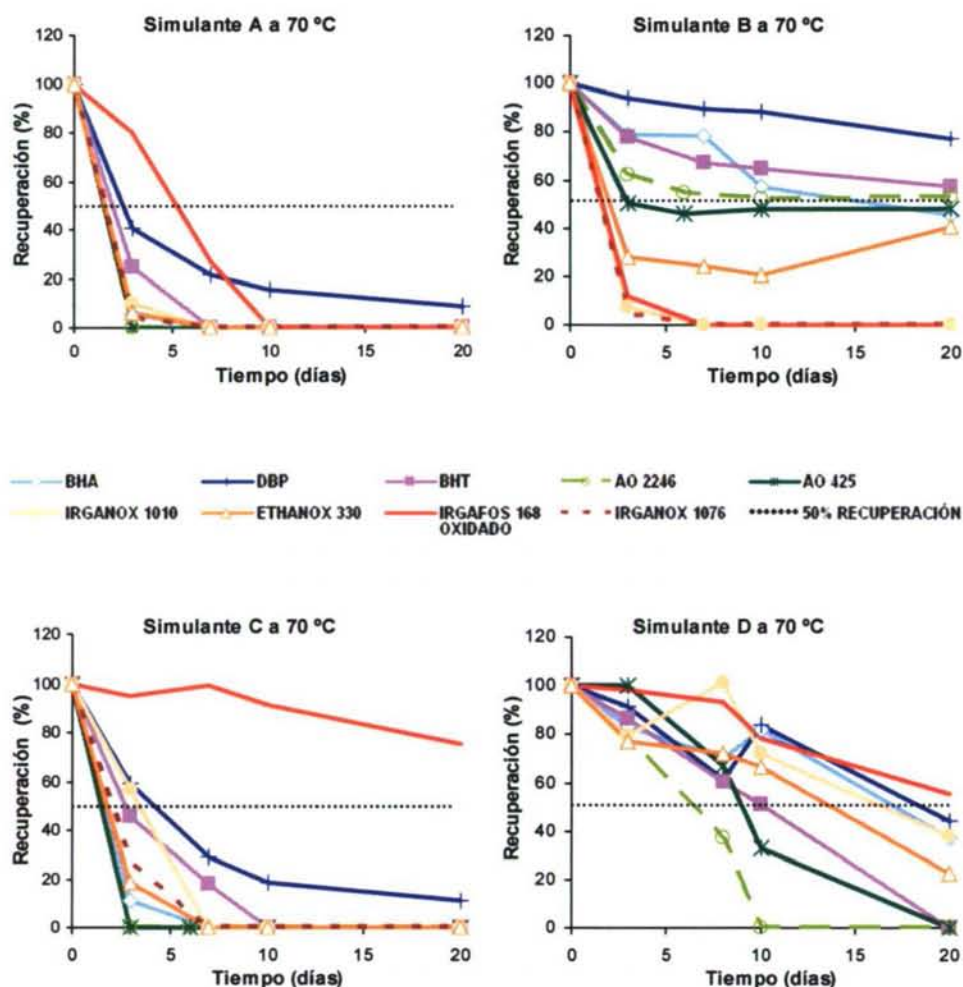


Figura 3. Ensayo de estabilidad para los antioxidantes en los simulantes de alimentos a 70 °C.

- Simulante D: los antioxidantes no se muestran estables durante el ensayo completo en contra de lo observado a temperaturas inferiores, aunque las recuperaciones van disminuyendo gradualmente. A los 10 días de haberse iniciado el ensayo, todos los compuestos se comportan de forma estable excepto AO 2246 y AO 425. A 20 días, las recuperaciones de todos los compuestos han disminuido

sustancialmente y sólo el Irgafos 168 oxidado se considera estable. Cabe destacar las dificultades que se encontraron para llevar a cabo la cuantificación de los antioxidantes en el ensayo a 70 °C, especialmente para los análisis a 20 días debido a que la señal cromatográfica correspondiente al aceite de oliva sufrió mayores cambios a lo largo del ensayo a esta temperatura. Al igual que a temperaturas inferiores, la respuesta cromatográfica de los antioxidantes se corrigió restándole la señal correspondiente al blanco de aceite de oliva sometido a las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

#### *Efecto del incremento de temperatura*

Si se observan los efectos de temperatura en los antioxidantes puede verse que en general, el aumento de temperatura causa un incremento de la degradación, aunque existen diferencias entre los simulantes:

- En los simulantes A y C la degradación aumenta sustancialmente con el aumento de la temperatura.
- En los simulantes B y D los antioxidantes apenas se ven afectados por el aumento de la temperatura.

En el simulante B, la estabilidad de los antioxidantes fenólicos de baja masa molecular, BHA, BHT y DBP es bastante buena incluso a altas temperaturas, aunque las recuperaciones son menores cuando la temperatura aumenta. Son estables a 10 días incluso en los ensayos a 70 °C y las recuperaciones únicamente disminuyen hasta el 50 % a 20 días. Los compuestos de masa molecular media, AO 2246 y AO 425 no se ven afectados por el aumento de temperatura mostrando recuperaciones muy similares para todas las temperaturas probadas. Los antioxidantes de alta masa molecular Irganox 1010, Irganox 1076 e Irgafos 168 oxidado son los



que sufren una mayor degradación a 70 °C y sus recuperaciones son menores al aumentar la temperatura. De esta forma, el simulante B (ácido acético al 3%) estaría protegiendo a los compuestos fenólicos de alta masa molecular contra las altas temperaturas. Esto está de acuerdo con lo observado en la bibliografía, ya que la descomposición de los compuestos fenólicos es sustancialmente más lenta en los disolventes ácidos que en los neutros o básicos [Schwope y col. 1987a, b]. Sin embargo, los compuestos de alta masa molecular son muy inestables en este simulante, incluso a temperaturas bajas.

En el simulante D la estabilidad no se modifica hasta la mayor temperatura del ensayo, 70 °C, los antioxidantes en aceite de oliva presentan un comportamiento estable para todas las temperaturas empleadas en los ensayos durante los primeros diez días del experimento, aunque las recuperaciones van disminuyendo cuando la temperatura aumenta.

## 4.2 Discusión de los resultados

No se han encontrado muchas referencias sobre la estabilidad de los antioxidantes estudiados, tan sólo se han podido recoger algunos datos sobre BHT, Irganox 1010, AO 2246 e Irganox 1076.

### *Simulantes acuosos:*

Los estudios de migración del BHT [Schwope y col. 1987a] e Irganox 1010 [Schwope y col. 1987a, b] se realizaron a partir de films de polietileno de baja densidad (PEBD) o copolímeros de etileno y acetato de vinilo en simulantes de alimentos o alimentos, encontrando que ambos antioxidantes se degradaban en disolución de etanol al 8% o 50% después de algunos días a 49°C. Estos coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos a 70 °C



donde ambos antioxidantes se fueron degradando completamente a lo largo del ensayo en el simulante A (agua destilada) o C (etanol al 10%) (figura 3).

Sin embargo, la evolución de la estabilidad observada para Irganox 1076 (figura 2) no coincide con el trabajo de Simoneau y Hannaert (1999), que obtuvieron una recuperación para el Irganox 1076 del 97% en etanol al 15% y del 103% en ácido acético al 3% para ensayos de estabilidad de 10 días a 40 °C.

Así mismo Spyropoulos (1998) obtiene buenas recuperaciones en sus estudios de la estabilidad de AO 2246 alcanzando una recuperación del 100% durante una hora a reflujo en etanol al 15% y del 83% para una hora a 100 °C en ácido acético al 3%.

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en este trabajo y los alcanzados por Simoneau y Hannaert (1999) y Spyropoulos (1998) se asocian a las condiciones de preparación del simulante sobrecargado. En este trabajo se ha utilizado una proporción de disolvente más elevada que asegura la solubilidad de todos los antioxidantes a temperatura ambiente:

- Simoneau y Hannaert (1999) sobrecargaron el simulante con una relación volumen de disolución patrón/volumen de simulante de 1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  mientras que en el presente trabajo la disolución de Irganox 1076 se preparó con una relación de 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .
- Spyropoulos (1998) sobrecargó el simulante con AO 2246 con una relación de 2  $\mu\text{L mL}^{-1}$  que en este trabajo fue de 15  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

#### *Simulante aceite de oliva:*

En aceite de oliva, de los antioxidantes estudiados sólo se encontraron datos bibliográficos sobre la estabilidad Irganox 1076 [Cooper y col. 1998, O'Brien y col. 1999] el cual no pudo ser estudiado en este

trabajo y el AO 2246. Así, Spyropoulos (1998) determinó la estabilidad del AO 2246 en aceite de oliva a una concentración doble a su LME obteniéndose una recuperación del 72% para un ensayo de 10 días/40°C. En las mismas condiciones de tiempo y temperatura, la recuperación obtenida en el presente trabajo fue del 82% (figura 2). Este autor llevó a cabo ensayos de estabilidad a temperaturas mayores: 1 hora a 100 °C en aceite de oliva obteniendo una recuperación del 100% y 1 hora a 175°C donde la recuperación fue del 85%. En los ensayos realizados en este trabajo a 70 °C, el AO 2246 parece ser estable a 3 días con una recuperación del 80%, pero en la siguiente medida, a 8 días ya mostró una recuperación del 37% (figura 3).

#### 4.3 Degradación del Ethanox 330

Aunque como ya se ha indicado, este estudio se planteó como el seguimiento de la pérdida de los antioxidantes fenólicos y dos derivados del antioxidante fosfito Irgafos 168 (el producto oxidado y el producto de hidrólisis), en los cromatogramas pertenecientes al ensayo de estabilidad del Ethanox 330 se observó la aparición de nuevos picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación que pueden haberse formado durante el ensayo de estabilidad:

- En los simulantes acuosos se observó la aparición de hasta 3 nuevos picos cromatográficos, por lo que dichos ensayos se prolongaron para seguir la evolución de los picos hasta 60 días.
- En el simulante D no fue posible distinguir la formación de los productos de degradación del E330, debido posiblemente a la alta señal de fondo que muestra la matriz con la consiguiente disminución de la sensibilidad del método, unido a la mayor estabilidad del compuesto en el aceite de oliva.

En la figura 4 se observa la formación de estos compuestos de degradación que tuvo lugar a lo largo del tiempo durante el ensayo de estabilidad en el simulante A a 40 °C.

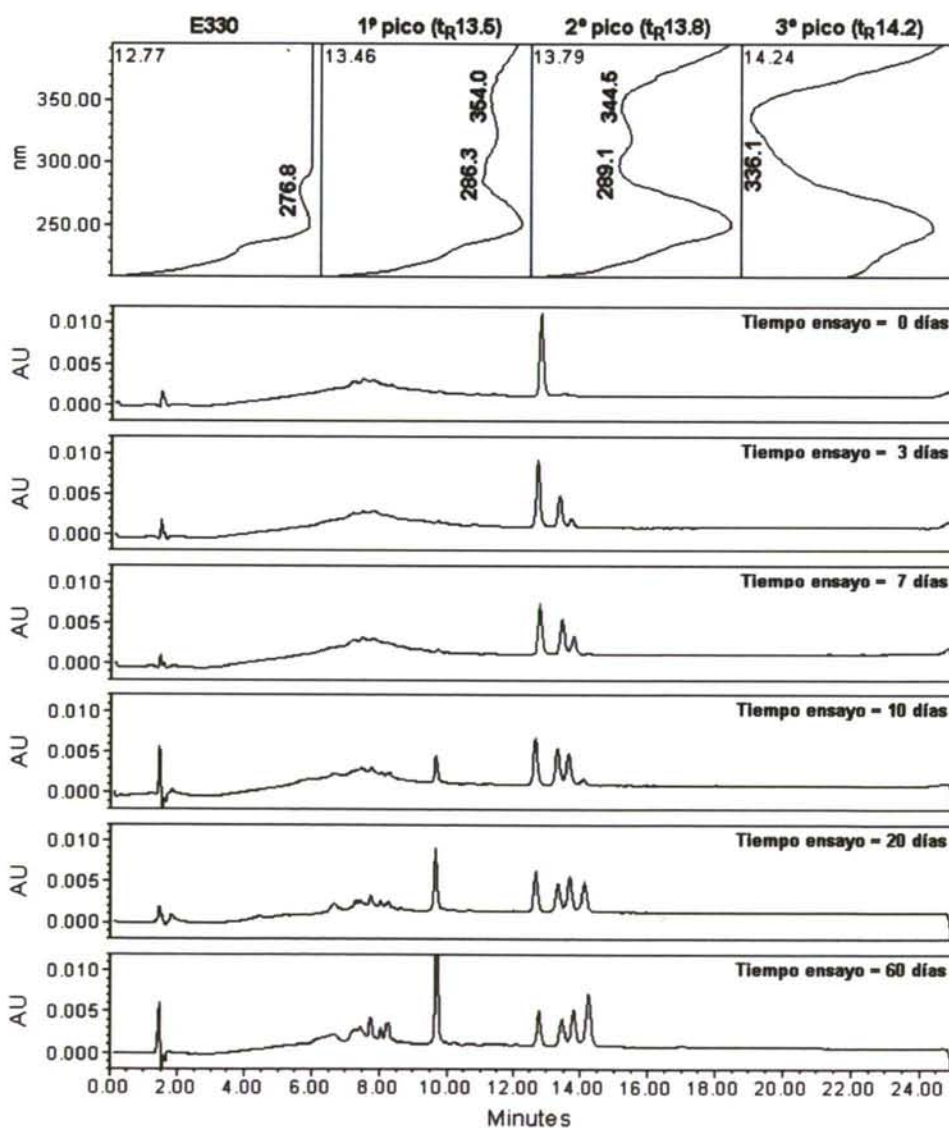


Figura 4. Cromatogramas obtenidos para el ensayo de estabilidad del E330 a 40 °C en el simulante A (276 nm) a lo largo de 60 días.



Los cromatogramas, extraídos a 276 nm, muestran la aparición de 3 nuevos picos cromatográficos que eluyen a tiempos de retención algo mayores al del E330, por lo que podrían llegar a interferir con la señal característica del Irgafos 168 oxidado en el caso de realizar una determinación simultánea de ambos. Se comprobó que el pico cromatográfico que aparece en torno a 9,5 minutos corresponde a una impureza ajena al E330, debida al uso de la columna cromatográfica, pues también se encuentra en el blanco cromatográfico previo a los análisis.

Los picos cromatográficos debidos a la degradación del Ethanox 330 se identifican con su tiempo de retención:

- 1<sup>er</sup> pico, correspondiente a un tiempo de retención de 13,5 minutos.
- 2<sup>o</sup> pico, que eluye a 13,8 minutos.
- 3<sup>er</sup> pico, que eluye a 14,2 minutos.

Su aparición no fue simultánea, sino que como se puede ver para el ensayo del simulante A a 40 ° C (figura 4) siguieron el orden primer, segundo y tercer pico de degradación. El área medida a 276 nm se fue incrementando a lo largo del ensayo hasta estabilizarse a 20-30 días para el primer y segundo pico mientras que para el tercero continuó aumentando hasta el final del ensayo.

La aparición de los tres compuestos de degradación se observó para los ensayos en los simulantes A y C a 40 y 70°C mientras que en el simulante B únicamente a la temperatura mayor, 70 °C. En la figura 5 se muestran las áreas medidas para cada pico cromatográfico a 276 nm en un intervalo de tiempo de 60 días. El incremento de temperatura provoca que se intensifique el efecto observado a 40 °C, de forma que el primer y segundo pico de degradación aumentan durante los primeros días de ensayo aunque las medidas posteriores a 10 días muestran que en lugar de estabilizarse



comienzan a decrecer en favor del último pico que continúa aumentando hasta el final del ensayo.

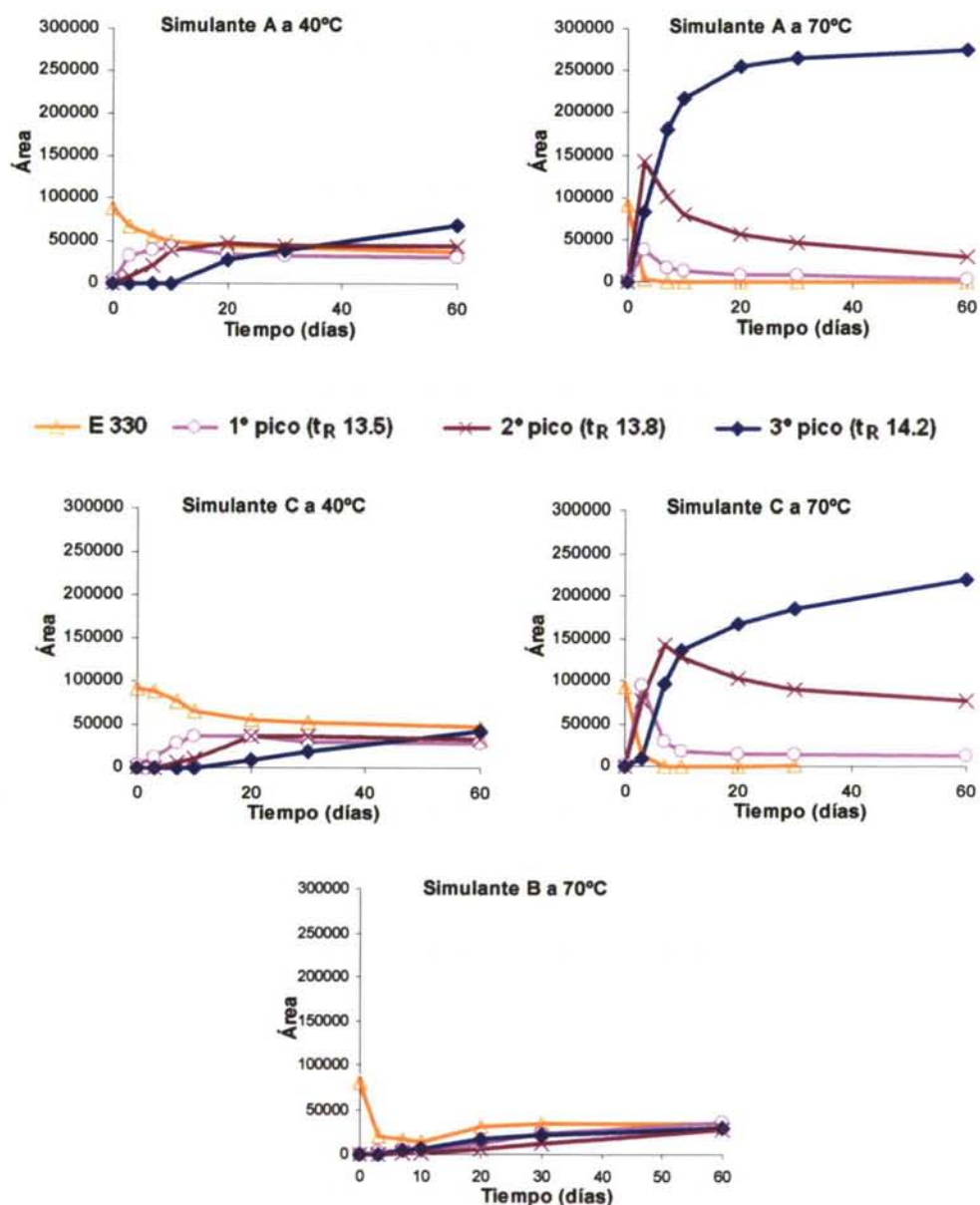


Figura 5. Áreas del E330 y sus compuestos de degradación a 276 nm.

La comparación entre las figuras en el simulante A y C corrobora la observación de que el efecto de la degradación es más acusado en el simulante A.

Por último, como se observa en la figura 5, la formación de los picos de degradación en el simulante B es mucho más lenta, teniendo en cuenta que la figura mostrada corresponde al ensayo a 70°C. A pesar de ello, a partir de 40 °C ya se experimenta pérdida del antioxidante, lo que indica que se pueden estar formando otros compuestos que no están siendo detectados con el método analítico.

El ensayo realizado pone de manifiesto el interés del estudio de los compuestos de degradación que se forman a partir de los antioxidantes, aunque en este trabajo no pudieron ser identificados, quedando pendiente como una posible continuación de esta memoria una mayor profundización en la determinación e identificación de los productos de degradación de los compuestos estudiados.

## **5 CONCLUSIONES**

Si se comparan los resultados obtenidos para cada simulante al aumentar la temperatura, se puede observar que en general los antioxidantes son menos estables a altas temperaturas. En los simulantes A y C el efecto de la temperatura es más acusado que en B y D.

Si se compara el efecto de cada simulante sobre la estabilidad de los antioxidantes a una temperatura determinada, cabe destacar que el aceite de oliva es el que permite la mayor estabilidad de los compuestos estudiados. Todos los antioxidantes considerados son estables en aceite de oliva durante 10 días a 5, 40 y 70°C excepto el AO 2246 y AO 425 a 70°C.

Entre los simulantes acuosos, el agua y el etanol al 10% permitieron la mayor estabilidad de los antioxidantes a baja temperatura, pero a

temperaturas altas la descomposición de los antioxidantes fue muy rápida independientemente de las características químicas de los compuestos y su masa molecular.

Los compuestos fenólicos de baja masa molecular BHA, BHT y DBP son estables en el simulante B incluso a altas temperaturas mientras que en los restantes simulantes acuosos sólo resultan estables a bajas temperaturas.

Los compuestos fenólicos de masa molecular media AO 2246 y AO 425 muestran un comportamiento independiente de la temperatura en el simulante B.

Los antioxidantes de alta masa molecular son muy inestables en el simulante B incluso a bajas temperaturas mientras que son estables a bajas temperaturas en los simulantes A y C.

Cabe destacar que el Irgafos 168 oxidado es estable en el simulante C incluso a 70°C.

Se ha observado claramente la aparición de tres picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación del Ethanox 330, siendo más adecuado el análisis HPLC-MS para su identificación, que pone de manifiesto el interés del estudio de estabilidad no sólo para cuantificar la pérdida de antioxidante sino para identificar los productos de degradación formados.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cooper, I.; Goodson, A. y O'Brien, A. (1998) Specific migration testing with alternative fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15, 72-78.

Demertzis, P.G. y Franz, R. (1998) A systematic study on the stability of selected polymer antioxidants in EU official aqueous and alternative food simulants using HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 15, 93-99.

Directiva 82/711/CEE del Consejo de 18 de octubre de 1982 que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 297, 23/10/1982, p. 26.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 220, 15/8/2002, p.18. Rectificación DO L39, 13/2/2003, p.1.

Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004, L71, 10/3/2004, p. 8.

Garde, J.A.; Catalá, R.; Gavara, R. y Hernández, R.J. (2001) Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 18, 750-762.

O'Brien, A.P.; Cooper, I. y Tice, P.A. (1997) Correlation of specific migration (Cf) of plastic additives with their initial concentration in the polymer (Cp). *Food Additives and Contaminants*, 14, 705-719.

O'Brien, A.; Goodson, A. y Cooper, I. (1999) Polymer additive migration to foods-a direct comparison of experimental data and values calculated from migration models for high density polyethylene (HDPE). *Food Additives and Contaminants*, 16, 367-380.

Pérez-Lamela, C.; Rijk R. y Simal-Gándara, J. (1998) Stability of the secondary antioxidant bis(2,4-di-tert-butylphenyl) pentaerythritol



diphosphite in food simulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 687-691.

Quinto-Fernández, E.J.; Pérez-Lamela, C. y Simal-Gándara, J. (2003) Analytical methods for food-contact materials additives in olive oil simulant at sub-mg Kg-1 level. *Food Additives and Contaminants*, 20, 678-683.

Schwöpe, A.D.; Till, D.E.; Ehntholt, D.J., Sidman, K.R. y Whelan, R.H. (1987a) Migration of BHT and Irganox 1010 from low-density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids. *Food and Chemical Toxicology* 25, 317-326.

Schwöpe, A.D.; Till, D.J.; Sidman, K.R. y Whelan, R.H. (1987b) Migration of Irganox 1010 from ethylene-vinyl acetate films to foods and food-simulating liquids. *Food and Chemical Toxicology*, 25, 327-330.

Simoneau, C. y Hannaert, P. (1999) Stability testing of selected plastics additives for food contact in EU aqueous, fatty and alternative simulants. *Food Additives and Contaminants*, 16, 197-206.

Spyropoulos, D.V. (1998) Stability testing of the plastics additives 2,4-dihydroxybenzophenone, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone, 2-hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone, 2-ethoxy-2-ethylhexanilide (tinuvin 312) and 2,2'-methylenebis(4-methyl-t-tert-butyl phenol) in aqueous and fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15, 362-369.

***Capítulo VIII***  
***Estudio de composición y migración de***  
***muestras***

---

## Capítulo VIII. Estudio de composición y migración de muestras

---

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>281</b>
1.1	Material y equipos.....	281
1.2	Reactivos .....	282
<b>2</b>	<b>Envases poliméricos comerciales .....</b>	<b>284</b>
2.1	Selección e identificación de envases .....	284
2.2	Determinación de antioxidantes mediante MAE-HPLC .....	286
2.3	Dendograma de los resultados obtenidos para muestras comerciales analizadas mediante MAE.....	290
2.4	Determinación de migración específica .....	291
<b>3</b>	<b>Poliolefinas extruidas en el laboratorio .....</b>	<b>297</b>
3.1	Características de las muestras extruidas en el laboratorio .....	297
3.2	Determinación de antioxidantes mediante MAE-HPLC .....	299
3.3	Determinación de migración específica .....	299
3.4	Aplicación de un modelo matemático para calcular los niveles de migración teórica .....	305
<b>4</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>305</b>
4.1	Estudio de muestras comerciales .....	305
4.2	Estudio de muestras extruidas en el laboratorio.....	306

<b>5</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>306</b>
----------	--	------------



## 1 INTRODUCCIÓN

En este último capítulo se ha aplicado la metodología analítica desarrollada en los capítulos anteriores a la determinación de antioxidantes y sus niveles de migración a partir de diferentes muestras.

Los objetivos de este capítulo son dos:

- Identificar los antioxidantes utilizados con más frecuencia en poliolefinas comercializadas para uso alimentario, determinando su concentración en la matriz y sus niveles de migración en los cuatro simulantes establecidos por la legislación.
- Caracterizar las posibles relaciones existentes entre los niveles de migración y las características de una matriz de PEBD extruida en el propio laboratorio.

Los análisis se realizaron utilizando los métodos analíticos puestos a punto en los capítulos anteriores:

- La extracción de antioxidantes se realizó mediante energía de microondas con posterior determinación mediante HPLC-UV con red de diodos (tabla V del capítulo VI).
- Los análisis de migración específica en simulantes acuosos se llevaron a cabo con HPLC-UV con red de diodos tras una etapa de preconcentración previa SPE con C<sub>18</sub> (capítulo V, tabla XII) y en aceite de oliva mediante dilución con THF previa a su determinación cromatográfica (capítulo IV, tabla IX).

### 1.1 Material y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia Waters (Mildford, MA, USA) modelo 2695 equipado con:
  - Bomba cuaternaria de gradiente.

- Sistema de mezcla a baja presión.
- Sistema de desgasificación a vacío en línea de cuatro canales.
- Inyector automático.
- Detector UV con red de diodos Waters (Mildford, MA, USA) modelo PDA 996.
- Sistema de recogida y procesado de datos Millenium<sup>32</sup> V. 3.20 (Waters, Mildford, MA, USA).
- Columna de acero inoxidable 3,0 x 150 mm empacada con relleno Symmetry C<sub>18</sub>, 3,5 µm de tamaño de partícula (Waters, Mildford, MA, USA).
- Extrusora de doble husillo Brabender DSE 20 (Duisburg, Alemania) con cinco zonas de calentamiento equipada con:
  - Sistema de rodillos Brabender Univex-Take-Off (Duisburg, Alemania).
  - Granceadora Brabender (Duisburg, Alemania).
- Sistema de microondas de laboratorio Milestone ETHOS TC (Sorisde, Italia) equipado con un carrusel de 10 bombas.
- Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier Broker (Ettlingen, Alemania).
- Sistema de vacío Büchi (Flawil, Suiza) V-500 equipado con controlador de presión Büchi B-721.
- Cartuchos C<sub>18</sub> Sep-Pack Plus 360 mg (Waters, Mildford, MA, USA).

## **1.2 Reactivos**

- Ácido acético glacial para HPLC (Panreac Química, Barcelona, España).

- Aceite de oliva Carbonell con acidez máxima de 0,4°.
- Acetonitrilo para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-RO (Millipore).
- Diclorometano para HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Metanol para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- THF para HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Papel de filtro N° 40 sin cenizas, Ø = 125 mm (Whatman, Maidstone, Reino Unido).
- Filtros de 45 µm y 4 mm de diámetro (Waters, Mildford, MA, USA).
- Granza de PEBD estabilizado Lupolen 1840H (Basell, USA).
- Antioxidantes:
  - 2,2'-metilenbis(4-metil-6-terc-butifenol) (AO 2246) CAS N° [119-47-1]; 2,2'-metilenbis(4-etil-6-terc-butilfenol) (AO 425) CAS N° [88-24-4]; BHA, mezcla de isómeros 2[3]-t-butil-4-hidroxianisol; 2[3]-t-butilhidroquinona monometil éter, mínimo 90% isómero-3 /9%- isómero-2-) CAS N° [25013-16-5]; 2, 6 di-terc-butil-p-cresol (BHT, 99%) CAS N° [128-37-0] y 1,3,5-trimetil-2,4,6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno (Ethanox 330, 99%) CAS N° [1709-70-2] de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
  - 2,4-di-terc-butil-fenol (DBP, ≥98%) CAS N° [96-76-4] de Fluka (Buchs, Suiza).
  - Fosfito de tris(2, 4-di-terc-butilfenilo) (Irgafos 168) CAS N° [31570-04-4]; tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol (Irganox 1010) CAS N° [6683-19-8] y 3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-propionato de

octadecilo (Irganox 1076) CAS [2082-79-3] de Ciba (Basel, Suiza).

## **2 ENVASES POLIMÉRICOS COMERCIALES**

Entre los materiales poliméricos que se utilizan como envases para la comercialización de alimentos se ha seleccionado un grupo formado principalmente por poliolefinas extruidas para determinar los niveles de los antioxidantes estudiados. En función de los resultados obtenidos, para algunas de las muestras se realizaron los ensayos de migración específica en los simulantes acuosos A, B y C y en aceite de oliva.

### **2.1 Selección e identificación de envases**

Se utilizaron envases comerciales disponibles en el mercado empleados para diferentes tipos de alimentos en su mayoría de naturaleza poliolefínica (tabla I).

En la tabla I se recogen las muestras seleccionadas agrupadas en función del tipo de alimento que están destinadas a envasar, de acuerdo con el Real Decreto 118/2003 y la Directiva 85/572/CEE. Asimismo se indica el código de análisis de la muestra, uso comercial específico y la naturaleza del material.

Aunque en sus procedimientos de control, la legislación restringe el tipo de simulante con el que debe realizarse el estudio de migración en función del alimento en concreto con el que va a entrar en contacto el envase, este estudio tiene como objetivo conocer la migración en todos los simulantes y no sólo la comprobación del cumplimiento de la legislación.



Tabla I. Muestras seleccionadas para la determinación de antioxidantes.

Nº referencia	Código de la muestra	Alimento que envasa	Naturaleza de la muestra
02. Cereales, derivados de los cereales, productos de galletería, de panadería y pastelería	CL/0036/04	Arroz integral	PEBD
	CL/0037/04	Pasta	PEBD
	CL/0042/04	Pan tostado	PP
	CL/0050/04	Palitos de pan	PVC
	CL/0043/04	Pan de leche	PP
	CL/0033/03	Pan de molde	PEBD
	CL/0047/04	Pan de molde	PEBD
	CL/0058/04	Pan de molde	PP
	CL/0059/04	Pan de molde	PP
	CL/0061/04	Pan de molde	PEBD
	CL/0056/04	Bizcochos	PEBD
	CL/0057/04	Bizcochos	PP
04. Frutas, hortalizas y sus derivados	CL/0040/04	Membrillo	PP
	CL/0048/04	Verduras frescas	PEBD
	CL/0049/04	Verduras frescas	PEBD
07. Productos lácteos	CL/0039/04	Leche entera	PEBD
	CL/0041/04	Leche entera	PEBD
	CL/0038/04	Yogurt	PEAD
	CL/0051/04	Queso rallado	PEBD
	CL/0052/04	Queso	PP
	CL/0060/04	Queso	PET
08. Productos diversos	CL/0035/04	Cubitos de hielo	PEBD
	CL/0034/04	Verduras congeladas	PEBD
	CL/0044/04	Verduras congeladas	PEBD
	CL/0045/04	Verduras y pasta congelada	PEAD
	CL/0046/04	Gambas congeladas	PEBD
	CL/0053/04	Sin determinar: el material se encuentra en la fase previa a la elaboración del envase	PP
	CL/0054/04		PP
	CL/0055/04		PP

Nº referencia [Real Decreto 118/2003 y Directiva 85/572/CEE]

En una primera etapa se identificó por análisis con espectrometría de transformada de Fourier (FTIR) la naturaleza de aquellas muestras que no indican el material del envase por medio de la correspondiente abreviatura del material utilizado (PP, PE...) o código numérico (04 para polietileno, 05 para polipropileno...).

## **2.2 Determinación de antioxidantes mediante MAE-HPLC**

El análisis de las muestras para determinar su composición en antioxidantes se llevó a cabo mediante la aplicación del método de extracción de microondas (tabla V del capítulo VI). Aunque inicialmente el método se puso a punto para una matriz de PEBD que incluía como antioxidantes Irganox 1076, Irgafos 168 e Irgafos 168 oxidado, se amplió su aplicación a otras matrices poliméricas, PEAD, PET, PP y PVC y a un mayor número de antioxidantes, BHA, BHT, DBP, AO 2246, AO 425 y Ethanox 330.

De esta forma, se llevó a cabo un análisis cualitativo de todos los antioxidantes estudiados: BHA, BHT, DBP, AO 2246, AO 425, E330, Irganox 1010, Irgafos 168 tanto fosfito como fosfato e Irganos 1076. Tras la extracción se procedió a la separación cromatográfica y cuantificación de los diferentes antioxidantes.

A modo de ejemplo se muestra en la figura 1 el cromatograma obtenido a 276 nm para la muestra CL/0054/04 en el que se observan varios picos sin identificar debidos a otro tipo de aditivos o impurezas que se están coextrayendo además de los antioxidantes estudiados.

La tabla II muestra los niveles de antioxidantes determinados en los envases comerciales estudiados. De los resultados anteriores subrayar:

- Todas las muestras comerciales analizadas contienen alguno de los antioxidantes estudiados, a excepción de las muestras CL/0035/04, bolsas de cubitos de hielo y CL/0051/04, envase para queso.

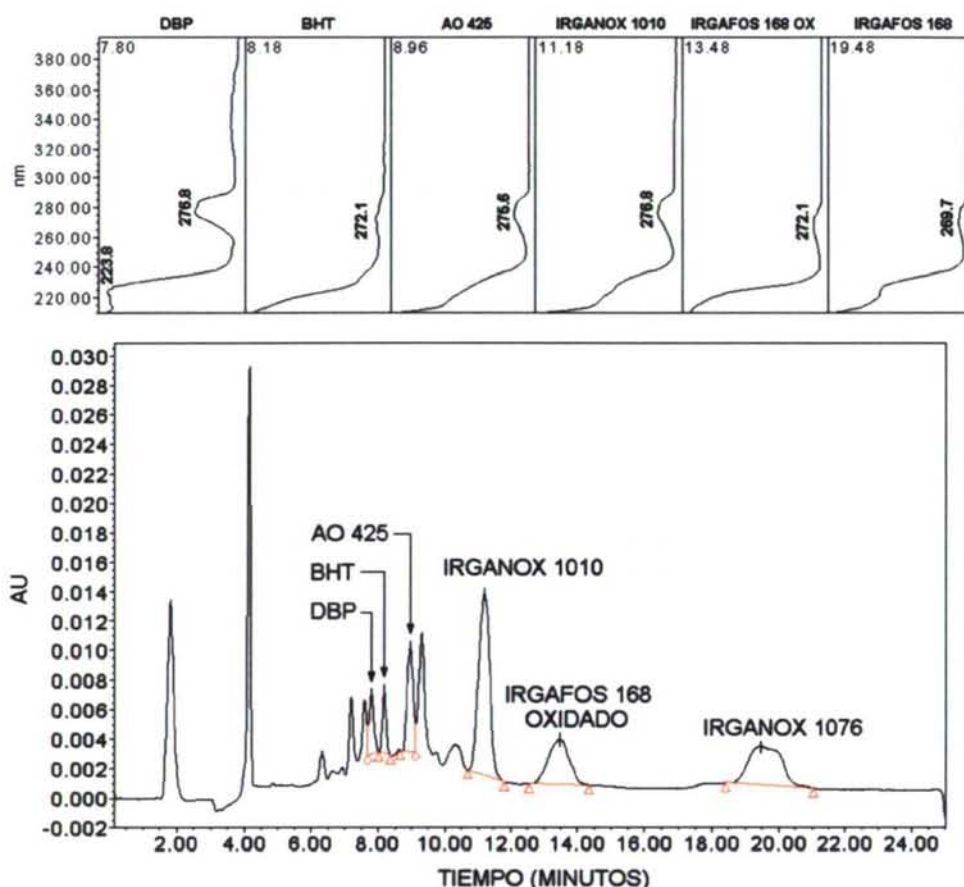


Figura 1. Muestra CL/0054/04 analizada mediante el método MAE-HPLC. Concentración:  $1,9 \text{ mg L}^{-1}$  DBP;  $2,1 \text{ mg L}^{-1}$  BHT;  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  AO 425;  $24 \text{ mg L}^{-1}$  Irganox 1010;  $58 \text{ mg L}^{-1}$  Irganox 168 oxidado y  $21 \text{ mg L}^{-1}$  Irganox 1076 (276 nm).

- Únicamente dos muestras, CL/0053/04 y CL/0054/04 mostraron presencia de los antioxidantes de menor masa molecular, DBP (producto de hidrólisis del Irganox 168), BHT, AO 2246 y AO 425, en una concentración en el rango  $3\text{-}60 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , bastante inferior a los otros antioxidantes.
- Sólo la muestra CL/0042/04, destinada al envase de pan tostado mostró la presencia del antioxidante Ethanox 330, que se comprobó que no se encuentra en la composición del alimento envasado.

Tabla II. Muestras de envases comerciales.

$\mu\text{g g}^{-1}$	DBP	BHT	AO 2246	AO 425	Irganox 1010	E330	Irgafos 168 ox	Irganox 1076	Irgafos 168
CL/0033/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1490	125	56
CL/0034/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	342	105	343
CL/0035/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CL/0036/04	nd	nd	nd	nd	369	nd	386	nd	252
CL/0037/04	nd	nd	nd	nd	215	nd	399	44	358
CL/0038/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28
CL/0039/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	224	96	34
CL/0040/04	nd	nd	nd	nd	119	nd	55	nd	173
CL/0041/04	nd	nd	nd	nd	80	nd	252	129	343
CL/0042/04	nd	nd	nd	nd	299	62	404	nd	240
CL/0043/04	nd	nd	nd	nd	391	nd	714	66	154
CL/0044/04	nd	nd	nd	nd	143	nd	407	138	216
CL/0045/04	nd	nd	nd	nd	102	nd	219	190	143
CL/0046/04	nd	nd	nd	nd	26	nd	175	326	428
CL/0047/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	129	nd	nd
CL/0048/04	nd	nd	nd	nd	228	nd	427	nd	123
CL/0049/04	nd	nd	nd	nd	556	nd	815	nd	483
CL/0050/04	nd	nd	nd	nd	497	nd	1523	nd	220
CL/0051/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CL/0052/04	nd	nd	nd	nd	204	nd	172	nd	183
CL/0053/04	3	14	6	5	162	nd	340	132	229
CL/0054/04	28	32	nd	61	360	nd	880	nd	315
CL/0055/04	nd	nd	nd	nd	274	nd	728	nd	nd
CL/0056/04	nd	nd	nd	nd	376	nd	369	100	429
CL/0057/04	nd	nd	nd	nd	1216	nd	2416	60	526
CL/0058/04	nd	nd	nd	nd	244	nd	498	73	355
CL/0059/04	nd	nd	nd	nd	315	nd	607	nd	303
CL/0060/04	nd	nd	nd	nd	53	nd	214	100	147
CL/0061/04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21	nd	221

nd = no detectable (< LD)



- La mayoría de los antioxidantes determinados fueron compuestos de alta masa molecular: los compuestos fenólicos Irganox 1010 (en el 72% de las muestras) o Irganox 1076 (45% de las muestras) junto con el Irgafos 168 que suele ir acompañado de su derivado oxidado (86% de las muestras). La determinación simultánea de los antioxidantes fenólicos y fosfito confirma que generalmente se utilizan de forma combinada.

Tal y como se ha indicado en el capítulo de la introducción, mientras que la legislación española y europea fijan límites de migración, la FDA establece unos valores máximos permitidos de antioxidantes en la poliolefina que constituye el envase, por lo que se compararon las concentraciones máximas determinadas para cada antioxidante en las muestras analizadas con los niveles permitidos por la FDA o en su defecto por la British Standard 1992 [Sheftel, 2000]. En la tabla III se observa que sólo una de las muestras analizadas, la CL/0057/04 presenta un contenido en Irgafos 168 mayor al permitido por la FDA, mientras que los demás valores son sensiblemente inferiores a los establecidos por la legislación.

*Tabla III. Comparación entre la concentración de antioxidantes en muestras y los niveles permitidos por la legislación.*

Antioxidante	Concentración máxima (%) determinada	Muestra	Nivel máximo establecido (%)	
			FDA [Title 21. 178.2010]	British Standard 1992 [Sheftel, 2000].
AO 2246	0,0006	CL/0053/04	0,1	--
AO 425	0,0061	CL/0054/04	--	0,5
Irganox 1010	0,12	CL/0057/04	0,5	0,5
Ethanolox 330	0,0062	CL/0042/04	0,5	--
Irgafos 168*	0,29	CL/0057/04	0,2 o 0,25	--
Irganox 1076	0,03	CL/0046/04	0,25	0,5

\* Se ha considerado la suma de los compuestos fosfito y fosfato

### 2.3 Dendograma de los resultados obtenidos para muestras comerciales analizadas mediante MAE

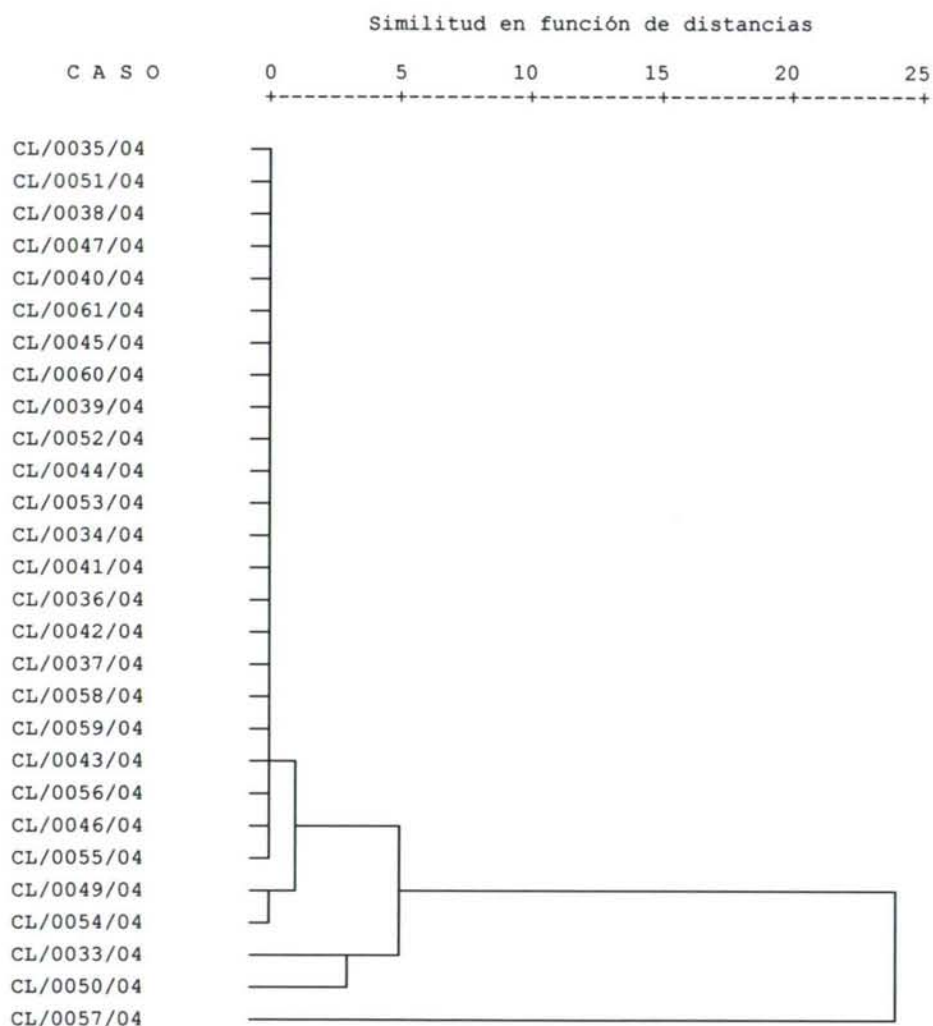
Una vez conocida la composición en antioxidantes se estudió la posibilidad de realizar agrupaciones en los resultados obtenidos mediante la aplicación de un método jerárquico [Ramis Ramos, G. y García Álvarez-Coque, 2001; Larrechi, 2004].

Para cada muestra se consideró junto con el contenido individual de cada antioxidante determinado (tabla II), la suma de los antioxidantes fenólicos: BHT, AO 2246, AO 425, E330, Irganox 1010 e Irganox 1076 que contiene cada matriz y la suma del Irgafos 168 y sus derivados oxidado (fosfato) y producto de hidrólisis (DBP), es decir, el contenido de cada muestra en antioxidantes primarios y secundarios.

En la figura 2 se muestra el dendograma construido con el programa SPSS para Windows V.11.5.1, considerando la distancia euclídea al cuadrado como medida de similitud entre dos objetos y utilizando el método de unión simple.

A una distancia en torno a 5 se pueden diferenciar tres grupos de muestras:

- Muestra CL/0057/04, que es la que posee la mayor concentración de antioxidantes.
- Muestras CL/0033/04 y CL/0050/04, que contienen la mayor concentración de antioxidantes fosfito.
- Restantes muestras, grupo en el que a una distancia en torno a dos se diferencia un nuevo subgrupo que comprende las dos muestras que contienen mayor cantidad de antioxidantes fosfito dentro de este tercer grupo (CL/0049/04 y CL/0054/04).



*Figura 2. Dendograma obtenido para las muestras de envases comerciales analizados mediante MAE-HPLC.*

## 2.4 Determinación de migración específica

Tanto de los tres grupos como del subgrupo obtenidos en el análisis jerárquico se seleccionó una muestra para realizar los ensayos de migración específica. Se midió el grosor de cada muestra considerando la importancia de este parámetro en los ensayos de migración [Garde y col., 2002] (Tabla IV).

Tabla IV. Muestras seleccionadas para el estudio de migración específica de antioxidantes.

Código muestra	Naturaleza	Origen	Grosor medio (micras)
CL/0033/04	PEBD	Muestra comercial	54
CL/0057/04	PP	Muestra comercial	28
CL/0054/04	PP	Muestra comercial	24
CL/0055/04	PP	Muestra comercial	48

Los ensayos de migración se realizaron poniendo en contacto la muestra de plástico con el simulante por una sola cara utilizando las celdas de migración descritas en el capítulo III, para lo que se empleó una lámina de muestra de aproximadamente 1 dm<sup>2</sup> en contacto con 165 mL de simulante. Las condiciones para la realización de los ensayos de migración fueron las indicadas anteriormente: 40 °C y 20 días para este tipo de ensayos empleando como simulantes agua destilada, ácido acético al 3%, etanol al 10% y aceite de oliva [Directiva 2002/72/CE].

Tras el contacto entre muestra y simulante se llevó a cabo el análisis cromatográfico de los simulantes acuosos tras una etapa de preconcentración previa mediante SPE con C<sub>18</sub> (capítulo V, tabla XII) y del aceite de oliva mediante dilución con THF en la relación 2 g muestra hasta 5 mL de THF con posterior determinación HPLC-UV con red de diodos (capítulo IV, tabla IX). En la tabla V se muestran los límites de detección y cuantificación de los métodos utilizados, SPE-HPLC para los simulantes acuosos y dilución-HPLC para el aceite de oliva, junto con los límites de migración específica de cada antioxidante en las condiciones de contacto.

Para comprobar que no existían interferencias se realizaron blancos de procedimiento en celda con todos los simulantes utilizados.



*Tabla V. Límites de detección y cuantificación para los métodos analíticos de migración específica, y límites de migración específica establecidos por la legislación.*

Celda con relación 165 mL: 1 dm <sup>2</sup> (simulante: área)					
	LME (mg dm <sup>-2</sup> )	Simulantes acuosos (SPE)		Simulante D (dilución)	
		LD (mg dm <sup>-2</sup> )	LC (mg dm <sup>-2</sup> )	LD (mg dm <sup>-2</sup> )	LC (mg dm <sup>-2</sup> )
BHA	5,0 <sup>b</sup>	4,2.10 <sup>-3</sup>	1,4.10 <sup>-2</sup>	4,4.10 <sup>-2</sup>	1,5.10 <sup>-1</sup>
DBP		4,4.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-2</sup>	6,3.10 <sup>-2</sup>	2,1.10 <sup>-1</sup>
BHT	0,50 <sup>b</sup>	5,1.10 <sup>-3</sup>	1,7.10 <sup>-2</sup>	7,7.10 <sup>-2</sup>	2,6.10 <sup>-1</sup>
AO 2246	0,25 <sup>*,a</sup>	4,6.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-2</sup>	5,7.10 <sup>-2</sup>	1,9.10 <sup>-1</sup>
AO 425		4,3.10 <sup>-3</sup>	1,4.10 <sup>-2</sup>	5,9.10 <sup>-2</sup>	2,0.10 <sup>-1</sup>
Irganox 1010	Sin LME <sup>a</sup>	3,6.10 <sup>-3</sup>	1,2.10 <sup>-2</sup>	1,2.10 <sup>-1</sup>	3,9.10 <sup>-1</sup>
Ethanox 330	Sin LME <sup>a</sup>	3,7.10 <sup>-3</sup>	1,2.10 <sup>-2</sup>	1,3.10 <sup>-1</sup>	4,5.10 <sup>-1</sup>
Irgafos 168 ox	Sin LME <sup>a</sup>	4,7.10 <sup>-3</sup>	1,6.10 <sup>-2</sup>	1,6.10 <sup>-1</sup>	5,4.10 <sup>-1</sup>
Irganox 1076	0,99 <sup>a</sup>	4,5.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-2</sup>	no se determinó	

\*Límite de migración específica total establecido para la suma de ambos compuestos

<sup>a</sup>Rectificación DO L39 de 13/2/2003, p. 1 de la Directiva 2002/72/CE

<sup>b</sup>Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004

Paralelamente a la determinación experimental de los niveles de migración de las matrices estudiadas a 40 °C y 10 días en los cuatro simulantes establecidos por la legislación, se realizó un cálculo teórico del nivel de migración esperado para cada matriz suponiendo que la migración fuese del 100 %, caso más estricto de migración en el que la transferencia de antioxidante al simulante sería completa. En este cálculo teórico se consideró la composición inicial de antioxidantes determinada en el estudio de microondas y la masa de film en contacto con el simulante en cada ensayo de migración.

En la tabla VI se muestran tanto los valores de migración teórica como experimentales obtenidos para las muestras:

Tabla VI. Resultados de ME en los cuatro simulantes A, B, C y D.

		Composición muestra (ug g <sup>-1</sup> )	Nivel de ME (mg dm <sup>-2</sup> )				
			Teórica 100%	Experimental			
Muestra	Analito				A	B	C
CL/0033/04 (PEBD) 54 µm	Irgafos 168 ox	1490	6,8.10 <sup>-1</sup>	d	d	nd	nd
	Irganox 1076	125	5,7.10 <sup>-2</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168	56	2,5.10 <sup>-2</sup>	nd	nd	nd	nd
	Suma Irgafos 168	1545	7,0.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
CL/0054/04 (PP) 24 µm	DBP	28	9,3.10 <sup>-3</sup>	nd	nd	nd	nd
	BHT	32	1,1.10 <sup>-2</sup>	nd	nd	nd	nd
	AO 425	61	2,0.10 <sup>-2</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irganox 1010	360	1,2.10 <sup>-1</sup>	d	nd	nd	nd
	Irgafos 168 ox	880	2,9.10 <sup>-1</sup>	d	d	d	nd
	Irgafos 168	315	1,0.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Suma Irgafos 168	1195	4,0.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
CL/0055/04 (PP) 48 µm	Irganox 1010	274	1,6.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168 ox	728	4,2.10 <sup>-1</sup>	d	nd	d	nd
	Suma Irgafos 168	728	4,2.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
CL/0057/04 (PP) 28 µm	Irganox 1010	1216	4,4.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168 ox	2416	8,7.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168	526	1,9.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Suma Irgafos 168	2941	1,1	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (< LD)

d: detectable (LD< concentración< LC)

- En las muestras analizadas no se observaron niveles de migración específica de los antioxidantes que pudiesen ser cuantificados con los métodos analíticos utilizados, detectándose únicamente trazas de antioxidantes para los simulantes acuosos de las muestras CL/0033/04, CL/0054/04 y CL/0055/04 cuya concentración fue inferior al límite de cuantificación del método (tabla V).

- El antioxidante para el que se han podido detectar los niveles de migración con más frecuencia ha sido el Irgafos 168 oxidado, que en los simulantes acuosos muestra en general una mejor estabilidad a 40°C que los otros antioxidantes, Irganox 1010 e Irganox 1076 presentes en las muestras a concentraciones importantes.
- El Irgafos 168 oxidado se ha detectado con más frecuencia en los simulantes acuosos donde es más estable, A y C.
- Los niveles de migración fueron tan bajos para todas las muestras que no pudo establecerse una relación de los mismos con la naturaleza de la matriz polimérica, espesor del film, tipo de simulante o concentración del antioxidante en el polímero.
- Si se comparan los niveles de migración experimental con los teóricos calculados considerando el 100% de migración, se observa que niveles teóricos de un antioxidante similares no son detectados experimentalmente en todos los casos. Por ejemplo, el Irgafos 168 oxidado que tiene un nivel de migración teórico de  $6,8 \cdot 10^{-1} \text{ mg dm}^{-2}$  es detectable en la muestra CL/0033/04 en los simulantes A y B, mientras que con un nivel de migración teórica ligeramente superior no se detecta en la muestra CL/0057/04 y en cambio sí lo hace en las muestras CL/0054/04 y CL/0055/04 con niveles de migración teóricos inferiores.
- Los niveles de migración teóricos supuesto el 100% de migración (tabla VI) son bastante inferiores a los LME establecidos por la legislación, pero podrían ser cuantificados utilizando el método analítico para la preconcentración en simulantes acuosos con SPE (tabla V), excepto para el DBP y el BHT en la muestra CL/0054/04. En el caso del simulante D, el método de dilución posee unos límites de detección y cuantificación más elevados, que sólo permitirían la cuantificación del Irgafos 168 total y la detección del Irganox 1010.

- Experimentalmente se confirma en todas las muestras que los valores de migración están muy por debajo del teórico del 100%.

Las figuras 3 y 4 muestran dos ejemplos de los cromatogramas obtenidos para los análisis de la migración específica de dos muestras, en los que pueden apreciarse los bajos niveles de antioxidantes detectados. La figura 3 corresponde a la migración de la muestra CL/0033/04 en ácido acético al 3% y la figura 4 a la de la migración de CL/0054/04 en agua destilada.

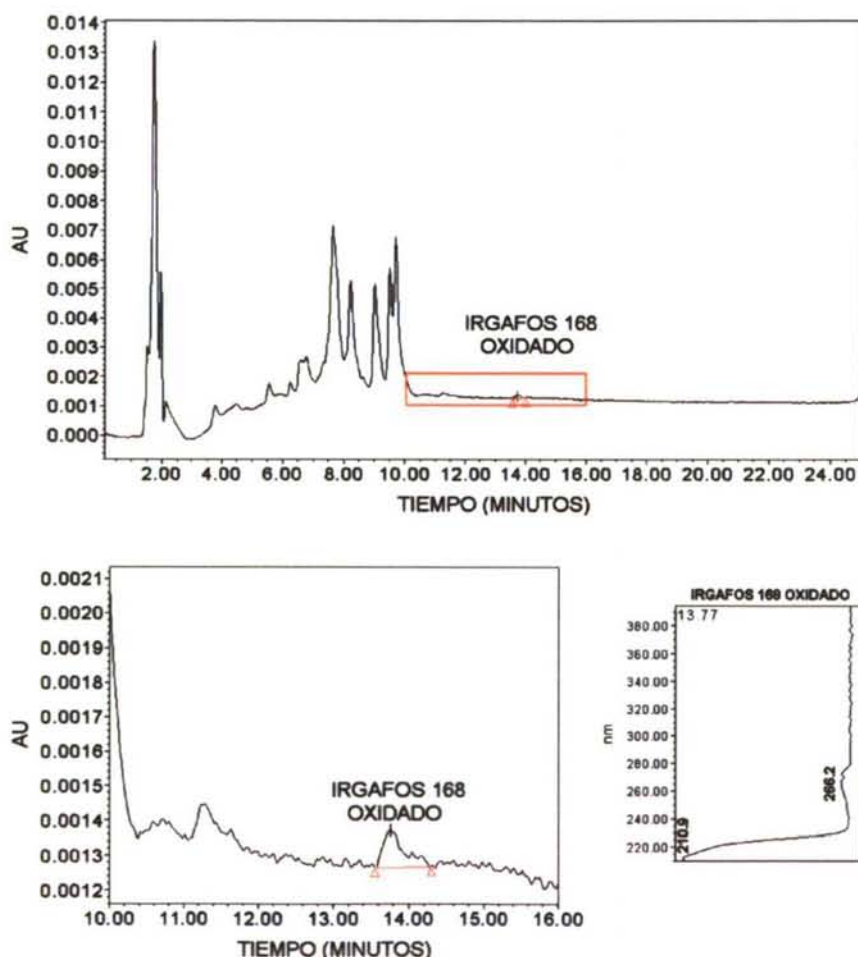


Figura 3. Migración específica en ácido acético al 3% (simulante B) de la muestra CL/0033/04 a 40 °C y 10 días. Concentración 0,089 mg L<sup>-1</sup> Irgafos 168 oxidado (276 nm).



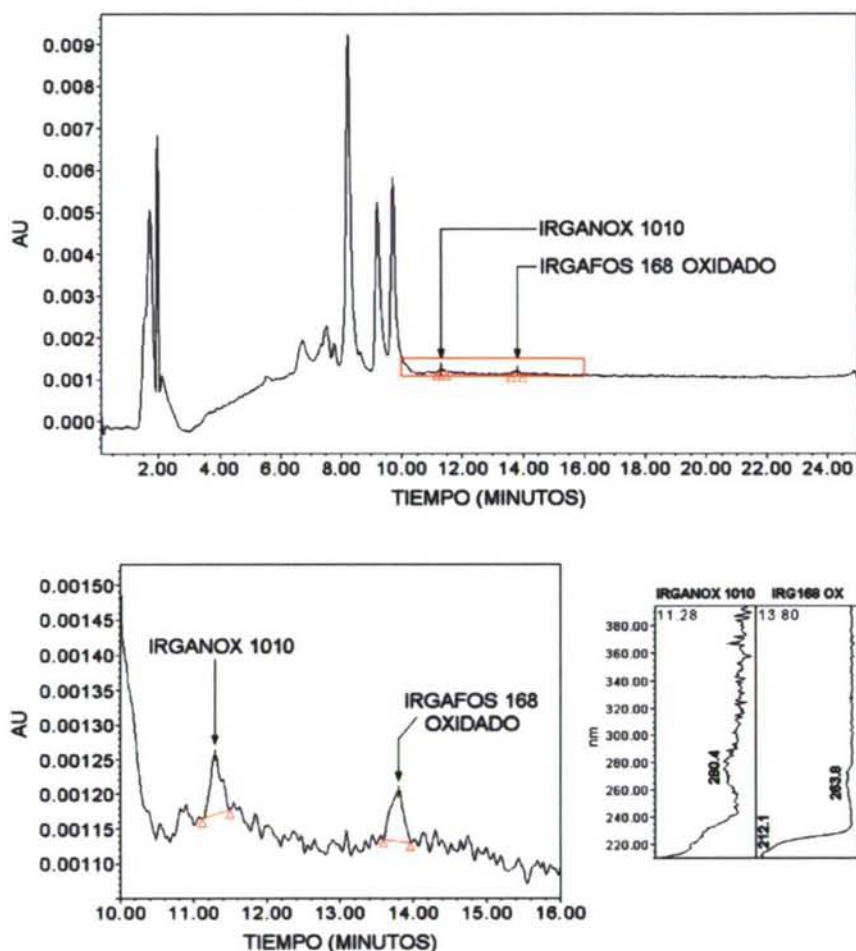


Figura 4. Migración específica en agua destilada (simulante A) de la muestra CL/0054/04 a 40 °C y 10 días. Concentración 0,044 mg L<sup>-1</sup> Irganox 1010 y 0,069 mg L<sup>-1</sup> Irgafos 168 oxidado (276 nm).

### 3 POLIOLEFINAS EXTRUIDAS EN EL LABORATORIO

#### 3.1 Características de las muestras extruidas en el laboratorio

Las muestras de PEBD extruidas en el laboratorio fueron obtenidas de forma similar a las utilizadas en el capítulo VI para poner a punto el

método de extracción mediante energía de microondas. De la misma manera, el film de PEBD se extruyó utilizando una extrusora de doble husillo con cinco zonas de calentamiento donde se indicaron 210°C de temperatura en la boquilla y el siguiente programa de temperaturas en las distintas zonas: 200/200/200/200/200 °C. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se parte de una mezcla de granza y aditivos re-extruida varias veces ( $n = 5$ ) para obtener una distribución homogénea de los antioxidantes con una concentración teórica de 0,2% (% en masa) para el Irgafos 168 y 0,4% (% en masa) para el Irganox 1076.
- Una porción de granza aditivada y homogeneizada se mezcló con granza de PEBD sin aditivar en una relación 1:1 y se extruyó de nuevo para obtener una muestra de film, CL/0030/04, con una concentración teórica de aproximadamente 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irgafos 168 y 2000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irganox 1076.
- Otra porción de granza aditivada y homogeneizada se mezcló con granza de PEBD sin aditivar en una relación 3:1 extruyéndose para obtener la muestra de film CL/0031/04, de concentración teórica aproximada 1500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irgafos 168 y 3000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Irganox 1076.

En la tabla VII se recogen las características de las muestras obtenidas, de grosor no uniforme por lo que se indica como un intervalo.

Tabla VII. Muestras seleccionadas para el estudio de migración específica de antioxidantes.

Código muestra	Naturaleza	Origen	Grosor medio ( $\mu\text{m}$ )
CL/0030/04	PEBD	Extruido en laboratorio	75-77
CL/0031/04	PEBD	Extruido en laboratorio	27-45

### 3.2 Determinación de antioxidantes mediante MAE-HPLC

Las muestras se analizaron mediante el método de extracción de microondas con posterior determinación HPLC-UV con red de diodos descrito en la tabla V del capítulo VI.

En la tabla VIII se recogen las concentraciones obtenidos para los antioxidantes Irgafos 168, Irganox 1076 e Irgafos 168 oxidado.

*Tabla VIII. Contenido en antioxidantes de las muestras extruidas en el laboratorio.*

$\mu\text{g g}^{-1}$	Irgafos 168 ox	Irganox 1076	Irgafos 168
CL/0030/04	243	1323	334
CL/0031/04	327	2311	668

En la figura 5 se muestra el cromatograma correspondiente al análisis de la muestra de concentración inferior, CL/0030/04, tras una dilución 2:5 con diclorometano, que presenta un número de picos inferior a las muestras comerciales estudiadas en el apartado anterior, debido a la menor aditivación de la muestra.

### 3.3 Determinación de migración específica

Para estudiar la migración específica de las muestras CL/0030/04 y CL/0031/04 se utilizaron bolsas selladas térmicamente. Debido a las características del film extruido, que es bastante estrecho, se formaron tubos de aproximadamente 25 cm x 4 cm para mantener la relación 100 mL de simulante por 2 dm<sup>2</sup> recomendada por la legislación [UNE-ENV 13130-1].

Las bolsas selladas se rellenaron con los simulantes A, B, C y D y se mantuvieron a 40°C durante 10 días, al cabo de los cuales los simulantes se analizaron mediante los métodos desarrollados con anterioridad: los simulantes acuosos con el método SPE-HPLC-UV con red de diodos (capítulo V, tabla XII) y el aceite de oliva mediante dilución previa de 2 g muestra

hasta 5 mL de THF y posterior determinación HPLC-UV con red de diodos (capítulo IV, tabla IX).

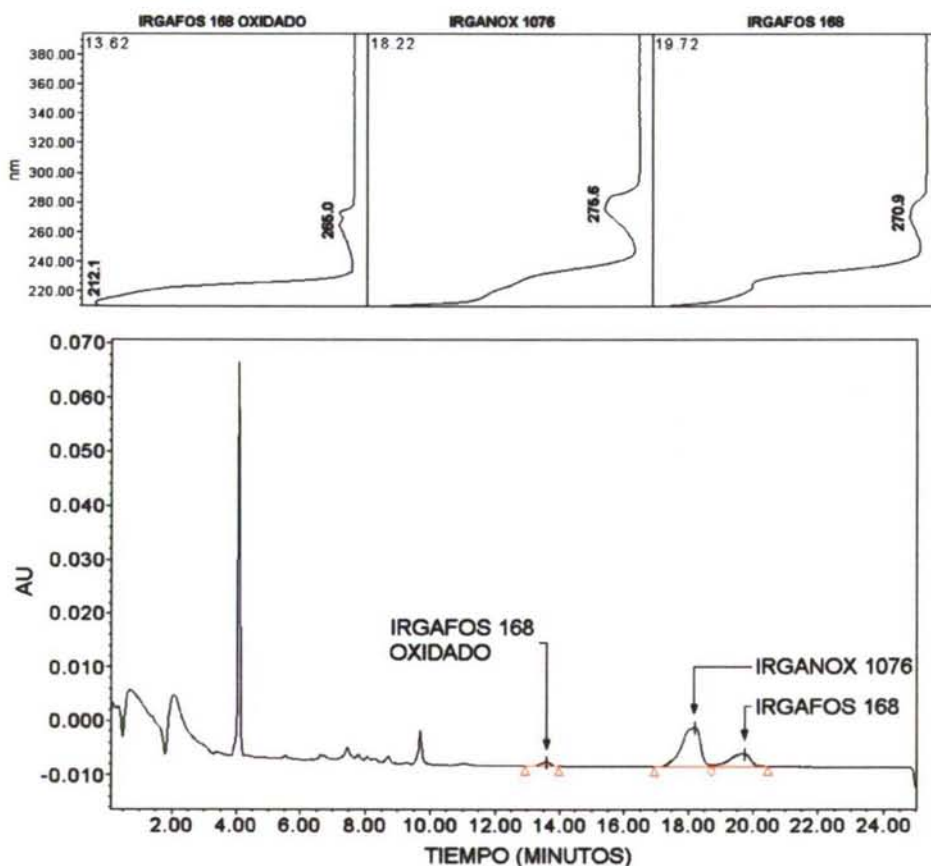


Figura 5. Muestra CL/0030/04 analizada mediante el método MAE-HPLC. Concentración: 6,9 mg L<sup>-1</sup> Irgafos 168 oxidado; 37 mg L<sup>-1</sup> Irganox 1076 y 9,4 mg L<sup>-1</sup> Irgafos 168 después de una dilución 2:5 (276 nm).

Teniendo en cuenta que en los ensayos con bolsas selladas se ha incrementado la relación de superficie de plástico en contacto con el volumen de simulante con respecto a los análisis en celdas, se han calculado los LME de los antioxidantes y los LD y LC de los métodos analíticos para las nuevas condiciones de los ensayos de migración (tabla IX).



Tabla IX. LME establecidos por la legislación, LD y LC de los métodos de ME para simulante acuoso y graso en bolsa sellada.

Bolsa sellada con relación 100 mL-2 dm <sup>2</sup> (simulante-área)					
	LME (mg dm <sup>-2</sup> )	Simulantes acuosos (SPE)		Simulante D (dilución)	
		LD (mg dm <sup>-2</sup> )	LC (mg dm <sup>-2</sup> )	LD (mg dm <sup>-2</sup> )	LC (mg dm <sup>-2</sup> )
BHA	1,5 <sup>b</sup>	1,3.10 <sup>-3</sup>	4,2.10 <sup>-3</sup>	1,3.10 <sup>-2</sup>	4,5.10 <sup>-2</sup>
DBP		1,3.10 <sup>-3</sup>	4,5.10 <sup>-3</sup>	1,9.10 <sup>-2</sup>	6,4.10 <sup>-2</sup>
BHT	0,15 <sup>b</sup>	1,5.10 <sup>-3</sup>	5,1.10 <sup>-3</sup>	2,3.10 <sup>-2</sup>	7,8.10 <sup>-2</sup>
AO 2246		1,4.10 <sup>-3</sup>	4,6.10 <sup>-3</sup>	1,7.10 <sup>-2</sup>	5,7.10 <sup>-2</sup>
AO 425	0,075 <sup>a</sup>	1,3.10 <sup>-3</sup>	4,3.10 <sup>-3</sup>	1,8.10 <sup>-2</sup>	6,0.10 <sup>-2</sup>
Irganox 1010	Sin LME <sup>a</sup>	1,1.10 <sup>-3</sup>	3,7.10 <sup>-3</sup>	3,6.10 <sup>-2</sup>	1,2.10 <sup>-1</sup>
Ethanox 330	Sin LME <sup>a</sup>	1,1.10 <sup>-3</sup>	3,7.10 <sup>-3</sup>	4,1.10 <sup>-2</sup>	1,4.10 <sup>-1</sup>
Irgafos 168 ox	Sin LME <sup>a</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup>	4,7.10 <sup>-3</sup>	4,9.10 <sup>-2</sup>	1,6.10 <sup>-1</sup>
Irganox 1076	0,30 <sup>a</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup>	4,6.10 <sup>-3</sup>	no se determinó	

\*Límite de migración específica total establecido para la suma de ambos compuestos

<sup>a</sup>Rectificación DO L39 de 13/2/2003, p. 1 de la Directiva 2002/72/CE

<sup>b</sup>Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004

La tabla X recoge los niveles de migración específica tanto teórica (calculando el 100% de migración) como experimental obtenidos para las dos muestras de PEBD extruidas con diferente concentración de antioxidantes.

De la observación de los resultados obtenidos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Para las muestras de PEBD extruidas en el laboratorio sólo han podido cuantificarse los niveles de migración específica para el simulante aceite de oliva mientras que en los simulantes acuosos los antioxidantes no han sido detectados.
- Si se comparan los valores de migración de las muestras CL/0030/04 y CL/0031/04 en el simulante D con las características de la muestra, concentración de antioxidante y grosor, puede verse que CL/0030/04,

que es la muestra con menor concentración de antioxidantes presenta un mayor nivel de migración de Irgafos 168 oxidado, lo cual podría explicarse por el mayor grosor de la muestra utilizada para los ensayos con aceite de oliva, 75-77  $\mu\text{m}$  para la muestra CL/0030/04 frente a 27-45  $\mu\text{m}$  para CL/0031/04. Considerando que se ha partido de una matriz extruida en las mismas condiciones de procesado, estos resultados muestran la importancia de las variables grosor y composición de la matriz en la migración a partir de una muestra.

Tabla X. Resultados de ME en los cuatro simulantes A, B, C y D.

		Composición del film (ug g <sup>-1</sup> )	Nivel de ME (mg dm <sup>-2</sup> )				
			Teórica 100%	Experimental			
Muestra	Analito			A	B	C	D
CL/0030/04 (PEBD) 75-77 μm	Irgafos 168 ox	243	1,7.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	3,6.10 <sup>-1</sup>
	Irganox 1076	1323	9,2.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168	334	2,3.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Suma Irgafos 168	577	4,0.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
CL/0031/04 (PEBD) 27-45 μm	Irgafos 168 ox	327	1,1.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	2,9.10 <sup>-1</sup>
	Irganox 1076	2311	7,7.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Irgafos 168	668	2,2.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd
	Suma Irgafos 168	995	3,3.10 <sup>-1</sup>	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (<LD)

- Si se tienen en cuenta los valores de migración supuesta una migración teórica del 100%, se observa que el compuesto que tiene unos valores de migración teórica inferiores, Irgafos 168 es el único compuesto que se ha podido cuantificar en los ensayos de migración, considerando que el Irganox 1076 no puede determinarse en aceite de oliva con el método analítico empleado.
- Los valores experimentales de migración en el simulante D de Irgafos 168 oxidado para las muestras CL/0030/04 y CL/0031/04 son superiores

a su nivel teórico estimado considerando una migración del 100%. Esto podría explicarse por la oxidación del Irgafos 168 en aceite de oliva, ya que el compuesto que se cuantifica con el método analítico utilizado es el fosfato. Si se suman la migración teórica de ambas especies de Irgafos 168, fosfito y fosfato, se obtiene una cantidad superior a la migración experimental, lo que confirmaría la hipótesis de la oxidación del Irgafos 168 en aceite de oliva durante el ensayo a 40°C y 10 días, que ha sido descrita por Riquet y col. (2002).

- Los límites de cuantificación de los métodos analíticos tanto en simulante acuoso como aceite de oliva (tabla IX), permitirían la cuantificación de todos los compuestos supuesta una migración teórica del 100%, a excepción del Irgafos 168 oxidado de la muestra CL/0031/04 en aceite de oliva que sólo sería detectable y el Irganox 1076 que no puede determinarse con el método empleado.
- Los valores de migración experimentales están muy por debajo de los valores teóricos calculados considerando un 100% de migración en los simulantes acuoso, mientras que en el aceite de oliva, los valores de migración teórico y experimental del Irgafos 168 como suma de ambas especies fosfito y fosfato, son bastante próximos, lo que confirma la mayor capacidad de migración de los antioxidantes en aceite de oliva.

La figura 6 muestra el cromatograma obtenido a 220 nm para la migración específica en aceite de oliva de la muestra CL/0030/04 a 40°C durante 10 días.

Si se comparan los resultados obtenidos para los ensayos de migración en muestras extruidas con los ensayos de muestras comerciales, se observa que mientras que para muestras comerciales los antioxidantes sólo pudieron ser detectados en los simulantes acuoso en las muestras extruidas pudieron ser cuantificados en aceite de oliva. Para explicar estos resultados hay que tener en cuenta dos factores: por una parte, los LD y LC



son menores para los ensayos realizados en bolsa sellada (tabla IX), en los que ha aumentado la relación superficie muestra:volumen de simulante con respecto a los ensayos en celda (tabla V) de forma que el ensayo de migración resulta más estricto, aunque se verá limitado por la solubilidad del antioxidante en el simulante, sobre todo en los simulantes acuosos. Por otra parte, se ha empleado un film de mayor grosor con lo que se dispone de una mayor cantidad de antioxidantes con posibilidad de migrar al simulante.

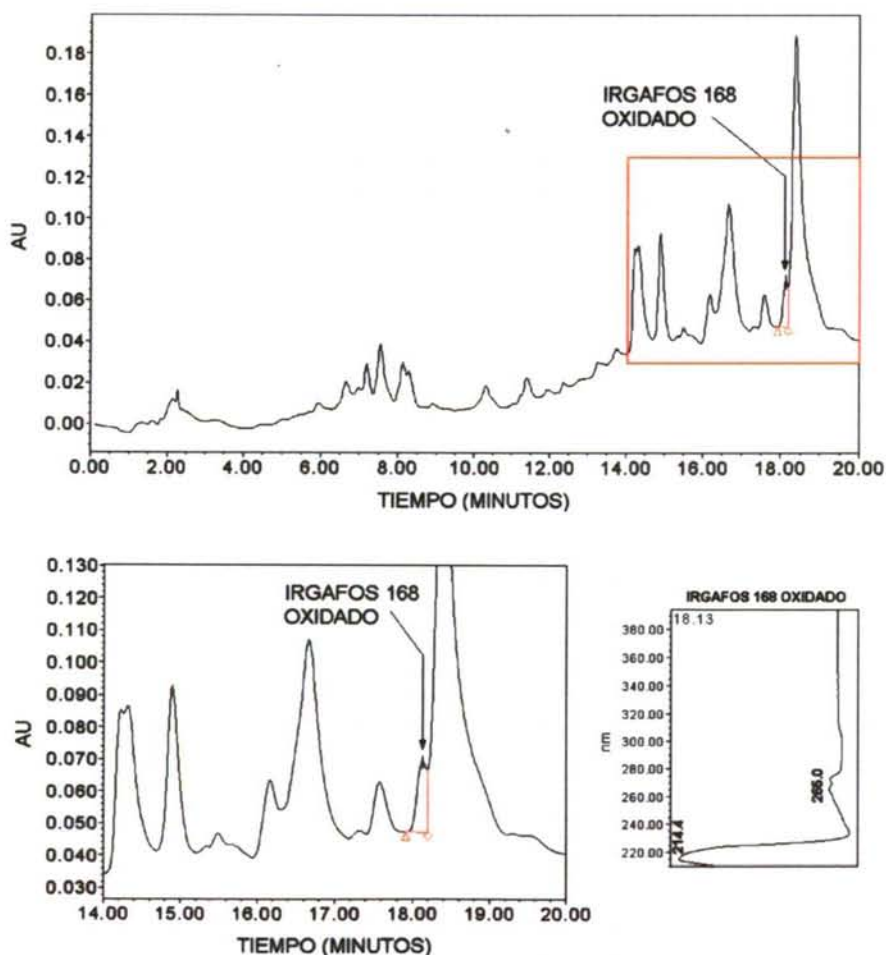


Figura 6. Migración específica en aceite de oliva de la muestra CL/0030/04 a 40 °C y 10 días. Concentración 7,6 mg Kg<sup>-1</sup> Irgafos 168 oxidado (220 nm).



### **3.4 Aplicación de un modelo matemático para calcular los niveles de migración teórica**

Se realizó un cálculo de la migración teórica en aceite de oliva utilizando un modelo matemático mediante la aplicación del programa informático multiwese.exe desarrollado por Reynier y col. (2002a, b) que puede ser descargado gratuitamente de la página web del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA): <http://www.inra.fr/Internet/Produits/securite-emballage>.

Se estimó la migración del Irgafos 168 en aceite de oliva a 40 °C durante 10 días y los resultados que se obtuvieron coincidieron con los calculados suponiendo el 100 % de migración teórica, por lo que no se consideró necesario su tabulación.

## **4 CONCLUSIONES**

### **4.1 Estudio de muestras comerciales**

La metodología desarrollada para la extracción de antioxidantes a partir de muestras resulta aplicable para la identificación de antioxidantes en muestras comerciales.

Entre los antioxidantes estudiados, que abarcan un rango de masas moleculares desde 180 hasta 1178 uma, los compuestos que se han determinado con mayor frecuencia son los de mayor masa molecular, comprobándose que las combinaciones de Irgafos 168 con un antioxidante fenólico Irganox 1010 o Irganox 1076 son ampliamente utilizadas en la fabricación de envases comerciales de alimentos.

La presencia conjunta del Irgafos 168 y su derivado oxidado en la mayoría de las muestras estudiadas pone de manifiesto el interés del procedimiento de extracción de microondas como una herramienta para controlar la calidad del material plástico.

Los niveles de los antioxidantes estudiados en las matrices plásticas son muy bajos, por lo que sus niveles de migración resultan muy inferiores a los LME establecidos por la legislación y para ser determinados precisan del uso de las técnicas de preconcentración puestas a punto en el capítulo V.

Los bajos niveles de migración específica determinados no han permitido establecer una relación entre las características de la matriz, espesor y concentración de antioxidantes y los niveles de migración alcanzados, para lo que sería necesario incrementar la sensibilidad de los métodos analíticos empleados, especialmente en el simulante aceite de oliva.

#### **4.2 Estudio de muestras extruidas en el laboratorio**

Los niveles de migración específica a partir de una matriz extruida en idénticas condiciones de procesamiento muestran la dependencia de la migración con el grosor del plástico y su concentración de antioxidantes.

### **5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Directiva 85/572/CEE del Consejo de 19 de diciembre de 1985, por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios, DO L372, 31/12/1985, p. 14.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 220, 15/8/2002, p. 18. Rectificación DO L39, 13/2/2003, p.1.

Directiva 2004/1/CE de la Comisión de 6 de enero de 2004, DO L7,13/1/2004, p. 45. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004, DO L71, 10/3/2004, p. 8. Enmienda a la Directiva 2002/72/CE.

FDA (*Food and drug administration*):

Title 21. Food and drugs (2004) Code of Federal Regulations (CFR). US Government Printing Office (GPO). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>. Sección 178.2010. Antioxidants and/or stabilizers for polymers.

Garde, J.A.; Catalá, R. y Gavara, R. (2002) "Cinética de la migración. Migración de antioxidantes en polipropileno" en Catalá, R. y Gavara, R. "Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos". *Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos*, Valencia, España. Cap. XII, p. 219-232.

Larrechi, M.S. (2004) Exploración de resultados multidimensionales: análisis de agrupaciones mediante métodos jerárquicos.  
<http://www.quimica.urv.es/quimio>

Ramis Ramos, G. y García Álvarez-Coque, M.C. (2001) Quimiometría. *Editorial Síntesis*. Capítulo 6. Exploración de datos, p. 133-156.

Real Decreto 118/2003 de 31 de enero. Materias plásticas. Aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos



plásticos destinados a entrar con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE nº 36, 11/2/2003, p.5310. Rectificación BOE nº 22, 20/5/2004, p.19049. Corrección de erratas BOE nº 279, 19/11/2004, p. 38192.

Reynier, A.; Dole, P. y Feigenbaum, A. (2002a) Migration of additives from polymers into food simulants: numerical solutions of a mathematical model taking into account and polymer interactions. *Food Additives and Contaminants*, 19 (1), 89-102.

Reynier, A.; Dole, P. y Feigenbaum, A. (2002b) Integrated approach of migration prediction using numerical modelling associated to experimental determination of key parameters. *Food Additives and Contaminants*, 19 (suplemento), 42-55.

Riquet, A.M; Scholler, D. y Feigenbaum, A. (2002) Tailoring fatty food simulants made from solvents mixtures (2): determining the equivalent migration behaviour of olive oil and of solvents in the case of polyolefins. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 582-593.

Sheftel, V.O. (2000) Indirect food additives and polymers. Migration and toxicology. Ed. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA.

UNE-ENV 13130-1:2000. Versión en español de la Norma Europea Experimental ENV 13130-1 de marzo 1999. Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias plásticas sujetas a limitaciones. Parte 1: guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes de alimentos.



***Capítulo IX***  
***Conclusiones***

---

Se ha desarrollado un método para la determinación de migración global en aceite de oliva que permite la cuantificación del aceite absorbido por el material plástico mediante extracción con energía de ultrasonidos y determinación HPLC-ELSD, como alternativa al establecido por la legislación. Este método se ha puesto a punto con una matriz de PP y presenta como ventajas su mayor sencillez, menor tiempo de análisis y volumen de disolvente y ausencia de interferencias con el método cromatográfico.

Se han puesto a punto dos métodos cromatográficos mediante HPLC en fase inversa empleando una columna Symmetry C<sub>18</sub>, elución con gradiente y detección UV con red de diodos que permiten la separación de los antioxidantes estudiados en fase acuosa y aceite de oliva, respectivamente, con buena resolución, un corto tiempo de análisis y parámetros de calidad satisfactorios. El método desarrollado para el análisis de los antioxidantes en aceite de oliva presenta una mayor variabilidad así como límites de detección y cuantificación más elevados, como era de esperar debido a la complejidad de la matriz, aunque los límites de detección y cuantificación de ambos métodos permiten la cuantificación de niveles de migración específica inferiores a los límites establecidos por la legislación. Únicamente la evaluación de la migración de AO 2246 y AO 425 puede exigir una etapa de preconcentración previa

Se han desarrollado métodos de pretratamiento de muestra para la determinación de la migración específica de antioxidantes en muestras acuosas, utilizando técnicas de extracción LL y SPE, que permiten disminuir sus límites de detección y cuantificación para caracterizar el perfil de migración de los antioxidantes, consiguiendo altas recuperaciones con una precisión satisfactoria. En la puesta a punto de esta metodología el pH ha demostrado tener una gran importancia. El procedimiento de SPE tiene la ventaja frente a la extracción LL de que permite mejorar los resultados de

recuperación y precisión, siendo válido para los tres simulantes acuosos establecidos por la legislación (A, B y C).

Los métodos desarrollados para la determinación de migración específica permiten el análisis simultáneo de todos los antioxidantes estudiados, que presentan un amplio rango de masas moleculares y polaridades y por lo tanto comportamientos diferenciados.

El estudio de la migración específica en el simulante aceite de oliva ha demostrado la dificultad que conlleva la extracción de los antioxidantes en esta matriz. Finalmente se propone la dilución del aceite de oliva previa a su determinación cromatográfica, que permite la determinación de todos los compuestos excepto el Irganox 1076.

Se ha puesto a punto la extracción mediante energía de microondas de Irgafos 168 e Irganox 1076 a partir de una matriz de PEBD mediante un estudio de diseño de experimentos, en el que el uso de diclorometano como disolvente de extracción demostró ser el factor más influyente, que ha permitido fijar un tiempo de extracción muy corto, siendo el extracto analizado directamente en HPLC. La estabilidad del fosfito Irgafos 168 durante la aplicación del método analítico, permite diferenciar la cantidad de Irgafos 168 que permanece sin reaccionar en el film del Irgafos 168 oxidado formado durante el procesado térmico o su tiempo de servicio, lo que puede resultar de utilidad para controlar la calidad del film.

Los ensayos de estabilidad de los antioxidantes en los simulantes A, B, C y D a 5, 40 y 70 °C, mostraron el efecto negativo de la temperatura sobre la estabilidad de los antioxidantes, que es más acusado en los simulantes A y C que en B y D. El aceite de oliva es, con diferencia, el simulante que permite la mayor estabilidad de los compuestos estudiados, mientras que entre los simulantes acuosos, el agua y el etanol al 10% permitieron la mayor estabilidad de los antioxidantes a baja temperatura y el ácido acético al 3% la de los antioxidantes fenólicos de baja masa

molecular BHA, BHT y DBP incluso a alta temperatura. Por otra parte, la aparición de picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación del Ethanox 330, puso de manifiesto el interés del estudio de estabilidad no sólo para cuantificar la pérdida de antioxidante sino para estudiar la formación de los productos de degradación.

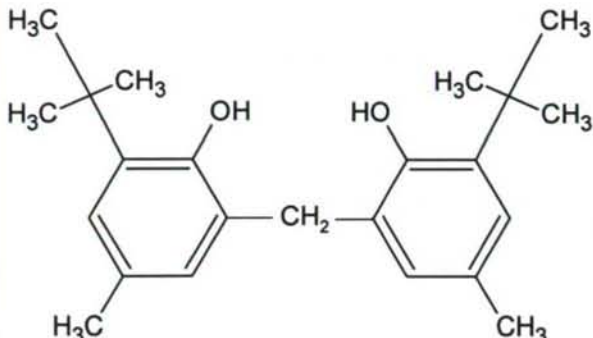
La aplicación de la metodología desarrollada ha permitido identificar los antioxidantes estudiados en diferentes matrices comerciales, mostrando la amplia utilización de las combinaciones de Irgafos 168 con un antioxidante fenólico Irganox 1010 o Irganox 1076 en la fabricación de envases alimentarios. Estos antioxidantes, a las concentraciones que se encuentran en las matrices plásticas alcanzan niveles de migración muy inferiores a los LME establecidos por la legislación de 10 días y 40 °C.

Los niveles de migración específica a partir de una matriz extruida en idénticas condiciones de procesado muestran la dependencia de la migración con el grosor del plástico y su concentración de antioxidantes.

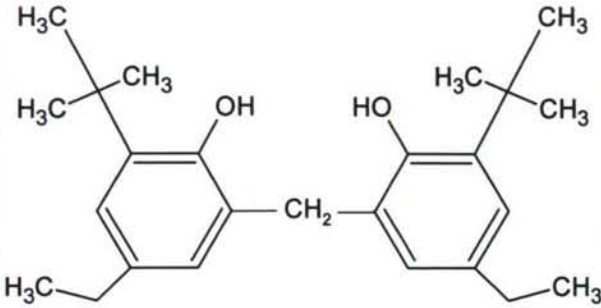


***Anexo***

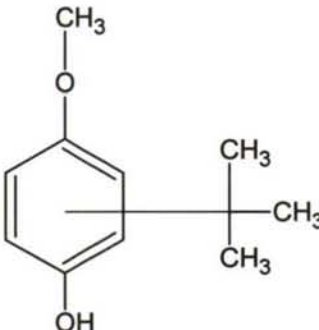
---

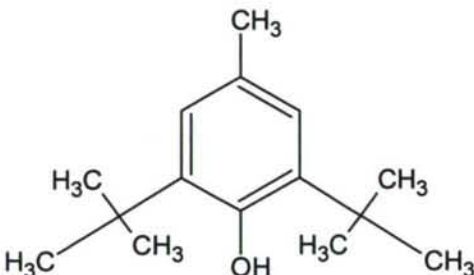
AO 2246		2, 2' -metilenbis (4-metil-6-terc-butilfenol)	
		Fórmula	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
		Nº CAS	119-47-1
		Nº referencia	66480
		LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	1,5 <sup>a</sup>
		M	340
		T fusión (°C)	Aprox. 125 <sup>b</sup>
		LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	5,0 en ratas 11 en ratones <sup>c</sup>
		Fuente comercial	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
Nombre CA Index: Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (9CI)			
Otros nombres :			
p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl- (8CI)			
2,2' Methylenebis(4-methyl-6-t-butylphenol)			
2,2'-Bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)methane			
2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-methylphenol)			
2,2'-Methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl]phenol			
2,2'-Methylenebis[6-tert-butyl-p-cresol]			
3,3'-Di-tert-butyl-2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylmethane			
6,6'-Di-tert-butyl-4,4'-dimethyl-2,2'-methylenediphenol			
6,6'-Methylenebis(2-tert-butyl-4-methylphenol)			
Bis(2-hydroxy-3-tert-butyl-5-methylphenyl)methane			
Bis(2-hydroxy-5-methyl-3-tert-butylphenyl)methane			
Bis(3-tert-butyl-2-hydroxy-5-methylphenyl)methane			
Bis(5-methyl-3-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)methane			
Bis(6-hydroxy-3-methyl-5-tert-butylphenyl)methane			
A 02246		Antioxidant BKF	
Additin RC 7115		Antioxidant NG 2246	
Advastab 405		Antioxidant OMB	
Agidol 2		AO 1	
Antage W 400		AO 1 (antioxidant)	
Anti Ox		Bisalkofen BP	
Antioxidant		BKF	
Antioxidant 2246		Calco 2246	

CAO 14	Noclizer NS 6
CAO 5	Nocrac NS 6
Catolin 14	Nonflex MPP
Chemanox 21	NS 6
Cyanox 2246	NSC 7781
GERI-BP 002A	Ongrostab 2246
Irganox 2246	Plastanox 2246
Lederle 2246	Product 2246
Lowinox 22M46	Santowhite PC
Lowinox 22M48	Sumilizer MDP
MBP 5	Sumilizer MDP-S
MDP	Vulkanox BKF
Naftonox 22M46	Yoshinox 2246G
NG 2246	Yoshinox 2246R

AO 425	2, 2' -metilenbis (4-etil-6-terc-butilfenol)		
	Fórmula	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	
	N° CAS	88-24-4	
	N° referencia	66400	
	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	1,5 <sup>a</sup>	
	M	369	
	T fusión (°C)	119 - 122 <sup>b</sup>	
	LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	10 en ratas <sup>c</sup>	
	Fuente comercial	Sigma-Aldrich (Steinheim Alemania)	
Nombre CA Index: Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl- (9CI)]			
Otros nombres:			
Phenol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl-4-ethyl- (6CI,7CI,8CI)]			
2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-ethylphenol)			
2,2'-Methylenebis[4-ethyl-6-tert-butylphenol]			
2,2'-Methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol]			
2,2-Methylenebis(4-ethyl-6-t-butylphenol)			
2,2-Methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol)			
Bis(2-hydroxy-3-tert-butyl-5-ethylphenyl)methane			
Bis(3-tert-butyl-5-ethyl-2-hydroxyphenyl)methane			
AO 425	NSC 7782		
Agidol 7	Nocrac NS 5		
Antage W 500	Nonflex EBP		
Antioxidant 425	Plastanox 425		
Chemanox 22	Swanox 425		
Cyanox 425	Yoshinox 425		
NS 5			



<b>BHA</b>	<b>Terc-butil-4-hidroxianisol</b> Mezcla de isómeros: 2[3]-t-butil-4-hidroxianisol; 2[3]-t-butilhidroquinona monometil éter, mínimo 90%-3 isomero/9%-2-isomero)	
	<b>Fórmula</b>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
	<b>N° CAS</b>	25013-16-5
	<b>N° referencia</b>	40720
	<b>LME (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	30 <sup>d</sup>
	<b>M</b>	180
	<b>T fusión (°C)</b>	48 - 55 <sup>b</sup>
	<b>LD<sub>50</sub> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	2,2 en ratas y 2,0 en ratones <sup>c</sup>
	<b>Fuente comercial</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
<b>Nombre CA Index:</b> Phenol, (1,1-dimethylethyl)-4-methoxy- (9CI)		
<b>Otros nombres:</b> Phenol, tert-butyl-4-methoxy- (7CI,8CI) 2(3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisole Butylated hydroxyanisole Butylhydroxyanisole tert-Butyl-4-hydroxyanisole tert-Butyl-4-methoxyphenol tert-Butyl-p-hydroxyanisole tert-Butylhydroxyanisole		
Antioxyne B	Embanox	
BOA	Protex	
BOA (antioxidant)	Sustane 1F	
E 320	Tenox BHA	

BHT	2, 6 di-terc-butil-p-cresol		
	Fórmula	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	
	Nº CAS	128-37-0	
	Nº referencia	46640	
	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	3 <sup>d</sup>	
	M	220	
	T fusión (°C)	69-70 <sup>b</sup>	
	LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	2-10 en ratas, varía según autor <sup>c</sup>	
	Fuente comercial	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)	

**Nombre CA Index:** Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (9CI)

**Otros nombres:**

p-Cresol, 2,6-di-tert-butyl- (7CI,8CI)

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol

2,6-Bis(tert-butyl)-4-methylphenol

2,6-Di-tert-butyl-4-cresol

2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluene

2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-1-hydroxybenzene

2,6-Di-tert-butyl-4-methylhydroxybenzene

2,6-Di-tert-butyl-p-methylphenol

2,6-Di-tert-butylcresol

2,6-tert-Butyl-4-methylphenol

3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluene

4-Hydroxy-3,5-di-tert-butyltoluene

4-Methyl-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenol

4-Methyl-2,6-di-tert-butylphenol

Butylated hydroxytoluene

Di-tert-Butyl-4-methylphenol

Di-tert-butyl-p-cresol

Di-tert-butylcresol

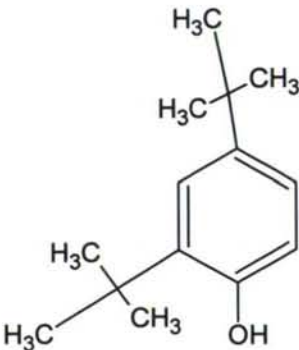
Dibutylated hydroxytoluene

Dibutylcresol

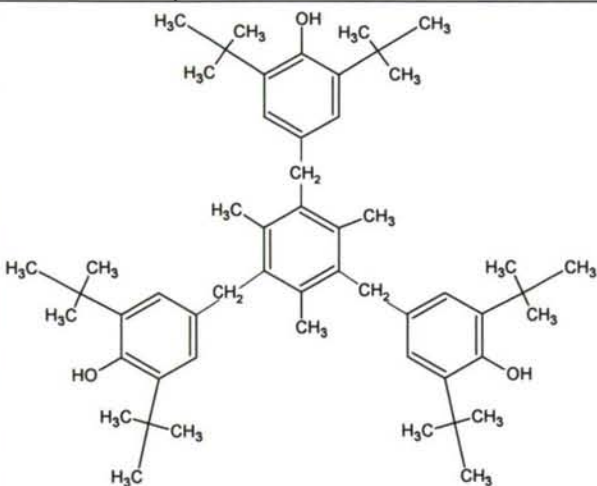
Dibutylhydroxytoluene

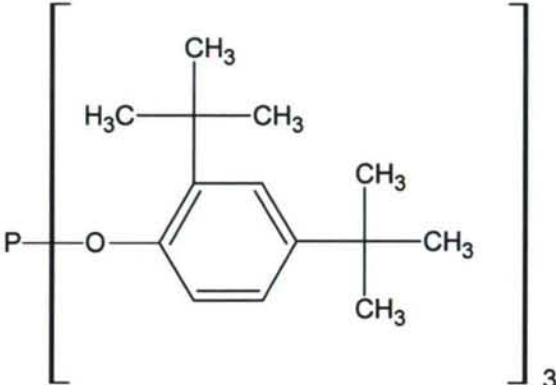
o-Di-tert-butyl-p-methylphenol

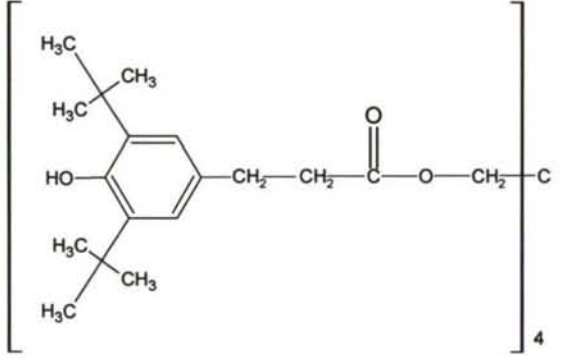
Antage BHT	CAO 3	Parabar 441
Antioxidant 264	Catalin CAO 3	Permanax BHT
Antioxidant 29	Chemanox 11	Popol
Antioxidant 30	DBPC	Ralox BHT
Antioxidant 4	Dalpac	Selosol H 633
Antioxidant 4K	Dibunol	Stavox
Antioxidant DBPC	E 321	Sumilizer BHT
Antioxidant KB	Impruvol	Sustane BHT
Antioxidant MPJ	Ionol	Swanox BHT
Antioxidant T 501	Ionol 1	T 501
Antox QT	Ionol 220	T 501 (phenol)
AO 29	Ionol 330	Tenamene 3
AO 4	Ionol BHT	Tenox BHT
AO 4K	Ionol CP	Tonarol
AOX 4	Ionol K	Topanol
AOX 4K	Ionole	Topanol BHT
Advastab 401	Kerabit	Topanol O
Agidol	Lowinox BHT	Topanol OC
Agidol 1	Lubrizol 817	Topanol OL
Alkofen BP	NSC 6347	Ultrinox 226
BAT	Naugard BHT	Vanlube PC
BHT 264	Nocrac 200	Vanlube PCX
BHT-C	Nocrac 2000	Vanox PC
Buks	Nonox TBC	Vianol
CAO 1	P 21	Vulkanox KB
Deenax	P 21 (phenol)	Yoshinox BHT

DBP	2, 4-di-terc-butil-fenol	
	Fórmula	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
	N° CAS	96-76-4
	N° referencia	---
	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	---
	M	206
	T fusión (°C)	54-58°C <sup>f</sup>
	LD <sub>50</sub> (µM)	150 en ratas <sup>e</sup>
	Fuente comercial	Fluka Buchs (Suiza)
Nombre CA Index: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- (9CI)		
Otros nombres:		
Phenol, 2,4-di-terc-butyl- (8CI)		
2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol		
2,4-Bis(terc-butyl)phenol		
2,4-Di-terc-butylhydroxybenzene		
2,4-Di-terc-butylphenol		
NSC 174502		



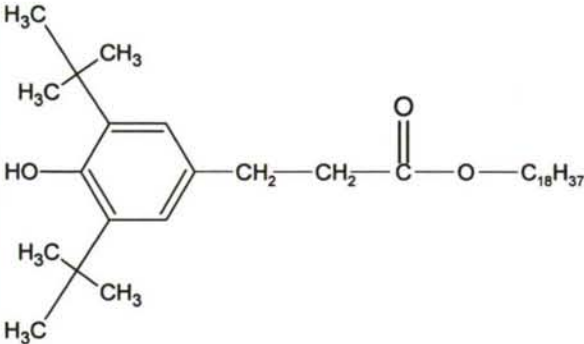
Ethanox 330	1, 3, 5-trimetil-2, 4, 6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil) benceno	
	Fórmula	C <sub>54</sub> H <sub>78</sub> O <sub>3</sub>
	Nº CAS	1709-70-2
	Nº referencia	95200
	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	Sin LME <sup>a</sup>
	M	775
	T fusión (°C)	240-245 <sup>b</sup>
	LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	1,5 en ratas <sup>c</sup>
Fuente comercial	Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)	
Nombre CA Index: Phenol, 4,4',4''-[(2,4,6-trimethyl-1,3,5-benzenetriyl) tris(methylene)] tris[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)- (9CI)		
Otros nombres:		
p-Cresol, α,α',α''-(2,4,6-trimethyl-s-phenenyl)tris[2,6-di-tert-butyl- (8CI)		
p-Cresol, α,α',α''-(trimethyl-s-phenenyl)tris[2,6-di-tert-butyl- (7CI)		
1,3,5-Dimethyl-2,4,6-tris(3,5-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)benzene		
1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxybenzyl)benzene		
1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)benzene		
1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytolyl)benzene		
1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)benzene		
1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-2,4,6-trimethylbenzene		
1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylmethyl)-2,4,6-trimethylbenzene		
2,4,6-Bis(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)mesitylene		
2,4,6-Tris(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxybenzyl)mesitylene		
2,4,6-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)mesitylene		
2,4,6-Tris(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)-1,3,5-trimethylbenzene		
2,4,6-Tris(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)mesitylene		
ADK Stab AO 330	Antioxidant 40	Irganox 330
AO 40	Ethyl 330	Mark AO 330
Agidol 40	Ethyl Antioxidant 330	NSC 85846
Alvinox 100	Good-rite 1330	Seenox 326M
Anox 330	Ionox 330	Yoshinox 1330
Antioxidant 330	Irganox 1330	

Irgafos 168		Fosfito de tris(2, 4-diterc-butilfenilo)	
		Fórmula	C <sub>42</sub> H <sub>63</sub> O <sub>3</sub> P
		Nº CAS	31570-04-4
		Nº referencia	74240
		LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	Sin LME <sup>a</sup>
		M	647
		T fusión (°C)	180-185 <sup>b</sup>
		LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	> 2 en ratas <sup>g</sup>
		Fuente comercial	Ciba (Basel, Suiza)
CA Index: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1) (9CI)			
Otros nombres:			
Phenol, 2,4-di-tert-butyl-, phosphite (3:1) (8CI)			
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphite			
A 2112	Mark 2112E		
ADK 2112	Naugard 524		
ADK Stab 2112	P 16		
AO 2	P 48		
Alkanox 240	P 48 (stabilizer)		
B 311	PKY 168		
Cyanox 2704	PL 10		
Doverphos S 480	PL 10 (stabilizer)		
Hostanox PAR 24	Phos 6		
Hostanox TM-PAR 24	Phosphite 168		
Hostanox VP-PAR 24	RA 168		
Irganox 168	RA 168 (antioxidant)		
Chinox 168	Sumilizer P 16		
JP 650	Tomiphos 202		
Mark 2112	Ultrinox 668		

Irganox 1010	Tetrakis[3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de pentaeritritol		
	Fórmula	C <sub>73</sub> H <sub>108</sub> O <sub>12</sub>	
	Nº CAS	6683-19-8	
	Nº referencia	71680	
	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	Sin LME <sup>a</sup>	
	M	1178	
	T fusión (°C)	110-125 <sup>b</sup>	
	LD <sub>50</sub> (mg Kg <sup>-1</sup> )	no se dispone del dato	
Fuente comercial	Ciba (Basel, Suiza)		
Nombre CA Index: Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, 2,2-bis[[3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-1-oxopropoxy]methyl]-1,3-propanediyl ester (9CI)			
Otros nombres:			
Hydrocinnamic acid, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-, neopentetetrayl ester (8CI)			
Hydrocinnamic acid, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-, tetraester with pentaerythritol			
Pentaerythritol, tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate)			
Carbyltetramethylene tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate)			
Neopentetetrayl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate			
Pentaerythritol 3-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionate (1:4)			
Pentaerythritol 4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenylpropionate			
Pentaerythritol tetra[3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propanoate]			
Pentaerythritol tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate)			
Pentaerythritol tetrakis(4-hydroxy-3,5-di-tert-butyl)hydrocinnamate			
Pentaerythritol tetrakis[(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]			
Pentaerythritol tetrakis[β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]			
Pentaerythritol tetrakis[β-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionate]			
Pentaerythritol tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate]			
Pentaerythritol tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]			
Pentaerythritol tetrakis[3-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionate]			
Pentaerythrityl β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate			
Pentaerythrityl tetra-β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate			
Pentaerythrityl tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl)propionate			
Pentaerythrityl tetrakis(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenylpropionate)			

Pentaerythrityl tetrakis[β-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionate]		
Pentaerythrityl tetrakis[3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propionate]		
Pentaerythrityl tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]		
Pentaerythrityl tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate		
Tetra[methylene 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]methane		
Tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamoyloxymethyl)methane		
Tetrakis(hydroxymethyl)methane tetrakis[β-{3,5-di(tert-butyl)-4-hydroxyphenyl}propionate]		
Tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyloxymethyl]methane		
Tetrakis[3-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionyloxymethyl]methane		
Tetrakis[[[β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl]oxy]methyl]methane		
Tetrakis[methylene(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate)]methane		
Tetrakis[methylene-3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propionate]methane		
Tetrakis[methylene-3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propionato]methane		
Tetrakis[methylene-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate]methane		
Tetrakis[methylene-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionato]methane		
A 1010	Cyanox 2110	Mark AO 60
A 1010 (antioxidant)	Dovernox 10	Naugard 10
AO 60	Fenozan 22	PH 1010
ADK Stab AO 60	Fenozan 23	Phenosane 23
AO 1	Hostanox O 10	RA 1010
AO 1010	R 1010	Ralox 630
AO 60;	IX 1010	Tabiace PH 1010
Anox 20	Irganox 1010FF	Sumilizer BP 101
Anox 20AM	Irganox 1010FP	Tetraalkofen BPE
Antioxidant 1010	Irganox 1040	Tominox TT
Arenox A 10	Irganox RA 1010	Tominox TT 50
BP 101	Iruga 1010	Ultrinox 210
Chinox 1010	KY 7910	



Irganox 1076		3-(3, 5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de octadecilo	
		Fórmula	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>
		Nº CAS	2082-79-3
		Nº referencia	68320
		LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	6,0 <sup>a</sup>
		M	531
		T fusión (°C)	51-52 <sup>b</sup>
		LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	>15 en ratas <sup>c</sup>
		Fuente comercial	Ciba (Basel, Suiza)
<p><b>Nombre CA Index:</b> Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, octadecyl ester (9CI)</p> <p><b>Otros nombres:</b></p> <p>Hydrocinnamic acid, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-, octadecyl ester (7CI,8CI)</p> <p>2,6-Di-tert-butyl-4-(octadecanoxycarbonyl)phenol</p> <p>2,6-Di-tert-butyl-4-[[octadecyloxy]carbonyl]ethylphenol</p> <p>3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenylpropionic acid octadecyl ester</p> <p>3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic acid octadecyl ester</p> <p>3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic acid octadecyl ester</p> <p>4-Carboxyethyl-2,6-di-tert-butyl-1-hydroxybenzene stearyl ester</p> <p>Octadecyl β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>Octadecyl β-(3,5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>Octadecyl β-(4'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)propionate</p> <p>Octadecyl β-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionate</p> <p>Octadecyl 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenylpropanoate</p> <p>Octadecyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate</p> <p>Octadecyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylpropionate</p> <p>Octadecyl 3,5-di-tert-butyl-4-oxyphenylpropionate</p> <p>Octadecyl 3-(3',5'-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate</p> <p>Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>Stearyl β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>Stearyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate</p> <p>Stearyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>n-Octadecyl β-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate</p> <p>n-Octadecyl β-(4'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)propionate</p>			

n-Octadecyl 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate  
 n-Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate  
 n-Octadecyl-3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propionate

ADK Stab AO 50	IR 1076	O 16
AO 4	IX 1076	Ralox 530
Anox PP 18	Irganox 1068	Selosol F 773
Antioxidant 1076	Irganox 1906	Sumilizer BP 76
Arenox A 76	Irganox 1976	Tominokusu SS
E 376	Irganox I 1076	Tominox SS
Hostanox M 016	Irganox L 107	U 276
Hostanox O 16	Mark AO 50	Ultrinox 276
I 1076	Naugard 76	

Nombre CA Index: Nombre Chemical Abstract Service.

LME: límite de migración específica establecido por la Directiva 2002/72/CEE y posteriores modificaciones.

Nº referencia: establecido por la Directiva 2002/72/CE y posteriores modificaciones.

\*Límite de migración específica total establecido para la suma de ambos compuestos.

<sup>a</sup>Rectificación DO L39, 13/2/2003, p. 1 de la Directiva 2002/72/CE.

<sup>b</sup>Joint Research Centre. European Commission. Analytical info <http://cpf.jrc.it/smt/>

<sup>c</sup>Sheftel, V.O. (2000) Indirect food additives and polymers. Migration and toxicology. Ed. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA.

<sup>d</sup>Directiva 2004/19/CE de la Comisión de 1 de marzo de 2004.

<sup>e</sup>Moridani, M.Y.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. (2003) Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rats hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 145, 213-223.

<sup>f</sup>Sigma-Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com>

<sup>g</sup>Ciba Specialty Chemicals <http://www.cibasc.com>



